

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Jana Kovalčíková

**Subpopulace mitochondrií v myokardu potkana
– vliv chronické hypoxie**

Mitochondrial subpopulations in rat myocardium
- effect of chronic hypoxia

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Olga Nováková, CSc.

Praha, 2012

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Květen 2012

Jana Kovalčíková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce doc. RNDr. Olze Novákové, CSc. za zadání tématu diplomové práce, cenné rady během mé experimentální práce a při sepisování diplomové práce. Dále děkuji za pomoc a konzultace doc. RNDr. Martinu Kalousovi, CSc., doc. RNDr. Františku Novákovi, CSc. a prof. RNDr. Františku Kolářovi, CSc..

Velice také děkuji kolektivu laboratoře Mgr. Petře Míčové, Mgr. Kristýně Kožichové, Mgr. Martině Klevstigové a Mgr. Markétě Hlaváčkové za rady a vedení při mé práci.

Diplomová práce byla vypracována v Laboratoři signalizace v myokardu na Katedře buněčné biologie a finančně zajištěna granty: MŠMT 0021620858, GA UK 429611, GA UK 100809.

Abstrakt

Adaptace na chronickou hypoxii indukuje endogenní kardioprotekci a zvyšuje tak odolnost srdce vůči ischemicko/reperfúznímu poškození. Důležitou roli v těchto procesech hrají srdeční mitochondrie, které tvoří kromě ATP také reaktivní kyslíkové molekuly (ROS). ROS produkované v nadměrném množství při ischemii/reperfúzi poškozují buňky, ale v nižší koncentraci se účastní signálních drah kardioprotekce indukované chronickou hypoxií. V srdci byly pozorovány dvě subpopulace mitochondrií, subsarkolemání mitochondrie (SSM) a intermyofibrilární mitochondrie (IMFM), které se odlišují nejen lokalizací v buňce, ale také po morfologické a biochemické stránce. Cílem této práce bylo zavedení metody izolace SSM a IMFM v naší laboratoři a analýzy jejich antioxidační kapacity po adaptaci na chronickou hypoxii. Dospělí potkani kmene Wistar byli drženi v normoxických podmínkách nebo vystaveni intermitentní výškové hypoxii (IHA; 7000 m, 5 dní v týdnu/8 hod denně, celkem 25 expozií). Subpopulace mitochondrií byly izolovány z levé komory srdcí potkanů a jejich funkčnost byla ověřena měřením spotřeby kyslíku a enzymových aktivit. IMFM měly ve srovnání s SSM vyšší spotřebu kyslíku a aktivity citrátsyntázy (CS) a sukcinátdehydrogenázy (SDH) se mezi subpopulacemi nelišily. Analýzy proteinu plazmatické membrány Na^+/K^+ -ATPázy pomocí Western blotu potvrdily čistotu frakcí mitochondrií a marker SSM konexin 43 (Cx43) nebyl přítomen u IMFM, což dokázalo, že obě mitochondriální frakce nejsou vzájemně kontaminovány. Hladina antioxidačního enzymu manganové superoxiddismutázy (MnSOD) se nelišila mezi oběma subpopulacemi mitochondrií, zatímco hladina aldehyddehydrogenázy 2 (ALDH2) byla u IMFM oproti SSM vyšší. IHA neměla vliv na aktivity CS a SDH u žádné z mitochondriálních subpopulací. IHA také neovlivnila expresi Cx43 u SSM ani MnSOD u SSM a IMFM. Naopak IHA snížila expresi ALDH2 u obou mitochondriálních subpopulací.

Klíčová slova: kardioprotekce, subpopulace mitochondrií, reaktivní kyslíkové molekuly, intermitentní výšková hypoxie, konexin 43, citrátsyntáza, sukcinátdehydrogenáza, antioxidační enzymy

Abstract

Adaptation to chronic hypoxia induces endogenous cardioprotection and increases the heart resistance to ischemia/reperfusion injury. The heart mitochondria, which produce reactive oxygen species (ROS) in addition to ATP, play an important role in these processes. During ischemia/reperfusion, ROS are produced in excessive amounts and damage the cells. However, in lower concentrations, ROS are involved in the signalling pathway of cardioprotection induced by adaptation to chronic hypoxia. In the heart, two mitochondrial subpopulations have been observed, subsarcolemmal mitochondria (SSM) and intermyofibrillar mitochondria (IMFM), which differ in cell localization as well as in morphological and biochemical properties. The aim of this work was to introduce the method of SSM and IMFM isolation in our laboratory and to analyse their antioxidative capacity after adaptation to chronic hypoxia. Adult male Wistar rats were kept either under normoxic conditions or exposed to intermittent high-altitude hypoxia (IHA; 7000 m, 5 days a week/8 hours a day, totally 25 exposures). Mitochondrial subpopulations were isolated from heart left ventricle and their functionality was verified by measuring oxygen consumption and enzyme activities. The IMFM had higher oxygen consumption in comparison with SSM and activities of citrate synthase (CS) and succinate dehydrogenase (SDH) did not differ between SSM and IMFM. Western blot analyses of the sarcolemmal membrane protein Na^+/K^+ -ATPase confirmed the purity of the mitochondria and the SSM marker connexin 43 (Cx43), which was absent in the IMFM, proved that the IMFM were not contaminated. The level of the antioxidant enzyme manganese superoxiddismutase (MnSOD) did not differ between the two mitochondrial subpopulations while level of aldehyddehydrogenase 2 (ALDH2) was higher in the IMFM in contrast to SSM. The adaptation to IHA did not affect the CS and the SDH activity in both mitochondrial subpopulations. Further, IHA did affect the expressin of neither Cx43 in the SSM nor the MnSOD in SSM and IMFM. On the other hand IHA decreased the expression of ALDH2 in both mitochondrial subpopulations.

Keywords: cardioprotection, mitochondrial subpopulations, reactive oxygen species, intermittent high-altitude hypoxia, connexin 43, citrate synthase, succinate dehydrogenase, antioxidant enzymes

Obsah

Seznam zkratek	8
1. Úvod.....	11
2. Literární přehled	12
2.1. Srdce a jeho zdroje energie.....	12
2.1.1. Mitochondrie	13
2.1.2. Subpopulace srdečních mitochondrií	14
2.1.3. Metodické přístupy při izolaci subpopulací mitochondrií.....	18
2.2. Protekce ischemického myokardu	19
2.2.1. Ischémie.....	19
2.2.2. Možnosti jak vyvolat endogenní kardioprotekci	20
2.2.3. Reaktivní formy kyslíku	24
2.2.4. Antioxidační enzymy.....	26
2.2.4.1. Manganová superoxiddismutáza	27
2.2.4.2. Aldehyddehydrogenáza 2	29
3. Cíle diplomové práce.....	31
4. Materiál a metody	32
4.1. Laboratorní zvířata	32
4.2. Experimentální model intermitentní výškové hypoxie.....	32
4.3. Odběr tkáně	33
4.4. Zdroje používaných chemikálií	33
4.5. Izolace subpopulací mitochondrií z levé komory srdeční	34
4.6. Stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové	36
4.7. Měření spotřeby kyslíku mitochondrií	37
4.8. Měření enzymových aktivit.....	38
4.8.1. Aktivita citrátsyntázy.....	38
4.8.2. Aktivita sukcinátdehydrogenázy	39
4.9. Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE).....	40
4.9.1. Příprava gelů na elektroforézu.....	40
4.9.2. Příprava vzorků mitochondrií na SDS elektroforézu	41
4.10. Western blotting	42

4.11. Imunodetekce.....	44
4.12. Metoda zesílené chemiluminiscence (ECL).....	45
4.13. Vyhodnocování signálu na filmech	46
4.14. Statistické vyhodnocování.....	47
5. Výsledky	48
5.1. Zavedení metody izolace subpopulací mitochondrií	48
5.1.1. Výtěžky izolace subpopulací mitochondrií	48
5.1.2. Charakterizace subpopulací mitochondrií pomocí konexinu 43	50
5.1.3. Stanovení Na ⁺ /K ⁺ -ATPázy v mitochondriálních frakcích (kontaminace plazmatickou membránou)	51
5.1.4. Spotřeba kyslíku mitochondriálních frakcí.....	52
5.1.5. Aktivita citrátsyntázy v mitochondriálních frakcích	53
5.1.6. Aktivita sukcinátdehydrogenázy v mitochondriálních frakcích.....	54
5.2. Adaptace na chronickou hypoxii	55
5.2.1. Vliv chronické hypoxie na hmotnostní parametry potkanů.....	55
5.2.2. Výtěžky izolace SSM a IMFM z normoxické a na chronickou hypoxii adaptované levé komory myokardu potkana	56
5.2.3. Aktivita citrátsyntázy v SSM a IMFM z normoxické a na chronickou hypoxii adaptované levé komory myokardu potkana	58
5.2.4. Aktivita sukcinátdehydrogenázy v SSM a IMFM z normoxické a na chronickou hypoxii adaptované levé komory myokardu potkana.....	60
5.2.5. Exprese konexinu 43 v SSM a IMFM z normoxické a na chronickou hypoxii adaptované levé komory myokardu potkana	61
5.2.6. Exprese MnSOD v SSM a IMFM z normoxické a na chronickou hypoxii adaptované levé komory myokardu potkana	63
5.2.7. Exprese ALDH2 v SSM a IMFM z normoxické a na chronickou hypoxii adaptované levé komory myokardu potkana	65
6. Diskuze	67
7. Shrnutí.....	73
8. Zdroje literatury.....	74

Seznam zkratek

acyl-CoA	acyl-koenzym A
ADP	adenosin-5'-difosfát
Alda-1	aktivátor aldehyddehydrogenázy 2
ALDH	aldehyddehydrogenázy
ALDH2	aldehyddehydrogenáza 2
AMPK	adenosinmonofosfátkináza
APS	persíran amonný
ATP	adenosin-5'-trifosfát
BPS	bromfenolová modř
BSA	albumin z hovězího séra (z angl. <i>bovine serum albumin</i>)
BW	tělesná hmotnost (z angl. <i>body weight</i>)
CAT	kataláza
CCCP	karbonylkyanid-m-chlorphenylhydrazon
CS	citrátsyntáza
Cu, Zn-SOD	měď-zinková superoxiddismutáza (SOD1)
Cx43	konexin 43 (z angl. <i>connexin 43</i>)
DCIP	2,6-dichlorofenolindofenol
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTMB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
DTT	D,L-dithiothreitol
ECL	metoda zesílené chemiluminiscence (z angl. <i>enhanced Chemiluminiscence</i>)
EC-SOD	extracelulární superoxiddismutáza (SOD3)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGTA	ethylenglykol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina
ETC	elektrontransportní řetězec (z angl. <i>electron transport chain</i>)
FCCP	karbonylkyanid-p-trifluormethoxyfenylhydrazon
GABA	kyselina γ-aminomáselná (z angl. <i>gamma-aminobutyric acid</i>)
Gp	trimerní G proteiny
GPX	glutathionperoxidáza

GRase	glutathionreduktáza
GSH	redukovaný glutathion
GSSG	oxidovaný glutathion
GTN	nitroglycerin (z angl. <i>glyceryl trinitrate</i>)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin- ethansulfonová kyselina
4HNA	4-hydroxy-2-nonenová kyselina
4HNE	4-hydroxy-2-nonenal
HRP	křenová peroxidasa (z angl. <i>horse-radish peroxidase</i>)
Hypo	hypoxie
HW	hmotnost srdce
IHA	intermitentní výšková hypoxie (z angl. <i>intermitent high-altitude</i>)
IL-1 β	interleukin-1 β
IR	ischemicko/reperfúzní
IMFM	intermyofibrilární mitochondrie
LV	levá komora
M	mozkový homogenát
MAO-A	monoaminoxidáza A
MAPK	proteinkináza aktivovaná mitogenem (z angl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MF	mikrozosomální frakce
MnSOD	manganová superoxiddismutasa (SOD2)
mitoK _{ATP}	mitochondriální na ATP závislé draslíkové kanály
MPTP	mitochondriální permeabilní tranzitní pór (z angl. <i>mitochondrial permeability transition pore</i>)
NADH	redukovaný nikotinamidadeninukleotid
NC	nitrocelulózová membrána
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ výměňkový mechanismus
Nor	normoxie
PI3K	fosfatidylinozitol-3-kináza
PAK	proteinkináza A
p _B	barometrický tlak
PKC	proteinkinasa C
PLC	fosfolipáza C
PLD	fosfolipáza D

pO ₂	parciální tlak kyslíku
PRX	peroxiredoxiny
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní molekuly kyslíku (z angl. <i>reactive oxygen species</i>)
RV	pravá komora (z angl. <i>right ventriculus</i>)
RyR	ryanodinový receptor
S	septum
SDH	sukcinátdehydrogenáza
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (z angl. <i>sodium dodecyl sulfate-polacrylamide gel electrophoresis</i>)
S.E.M.	střední chyba průměru (z angl. <i>standard error of the mean</i>)
SOD	superoxiddismutáza (z angl. <i>superoxide dismutase</i>)
SSM	subsarkolemální mitochondrie
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TK	tyrozinkináza
TMPD	tetramethyl-p-fenylendiamin
TNF- α	faktor nekrotizující nádory α (z angl. <i>tumor necrosis factor α</i>)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTBS	fyziologický roztok pufrovaný Tweenem 20
UV	ultrafialový (z angl. <i>ultraviolet</i>)
v/v	ředění objem/objem (z angl. <i>volume/volume</i>)
w/v	ředění hmotnost/objem (z angl. <i>weight/volume</i>)
Ψ ϵ RACK	aktivátor proteinkinázy C ϵ

1. Úvod

Kardiovaskulární choroby postihující srdce a cévy jsou hlavní příčinou úmrtí ve vyspělých zemích světa včetně České republiky. V současné době se tyto choroby stávají již celosvětovým problémem a jsou příčinou velké části světové mortality. Jedná se zejména o ischemickou mozkovou příhodu, ischemickou chorobu srdeční a její akutní formu – infarkt myokardu.

Hlavní příčinou těchto onemocnění je kromě genetické predispozice špatný životní styl. Mezi rizikové faktory patří kouření, strava s nadměrným obsahem tuků, konzumace velkého množství alkoholu, nedostatečná konzumace ovoce a zeleniny a nedostatek pohybové aktivity. K tomu přispívá špatné životní prostředí a přílišné vystavení stresu. S těmito faktory souvisí vysoký krevní tlak, vysoká hladina cholesterolu, obezita a diabetes. Nejúčinnější ochranou proti těmto onemocněním je tedy prevence.

Mnoho laboratoří se zabývá výzkumem srdečních onemocnění a hledají možnosti, jak zvýšit odolnost myokardu před ischemicko/reperfúzním (IR) poškozením. Odolnost myokardu vůči akutnímu IR poškození indukuje adaptace na chronickou hypoxii. Mechanismus takto vyvolané endogenní kardioprotekce ještě není zcela známý, a proto se úsilí řady laboratoří soustřeďuje na jeho objasnění a možnosti využití v prevenci a terapii srdečního poškození.

Zásadní roli v indukci kardioprotekce hrají mitochondrie jako producenti energie, reaktivních kyslíkových molekul (ROS) a zprostředkovatelé apoptózy. ROS mají duální roli. Je známo, že v nižších koncentracích hrají roli v signálních drahách kardioprotekce, ale v případě vzrůstu jejich koncentrace, například při ischemii/reperfúzi, mají škodlivý účinek. Oxidačnímu poškození se mitochondrie brání pomocí antioxidačního systému, kam patří například manganová superoxiddismutáza (MnSOD), odstraňující superoxidový radikál ($O_2^{\cdot-}$), a aldehyddehydrogenáza 2 (ALDH2), která zajišťuje ochranu před toxickými aldehydy. V srdečním svalu byly pozorovány odlišné subpopulace mitochondrií a tato diplomová práce se věnuje jejich rozdílné úloze v kardioprotektivním působení indukovaném chronickou hypoxií.

Mým úkolem bylo zaměřit se na izolaci těchto subpopulací mitochondrií, jejich charakterizaci pomocí enzymových aktivit a přítomnosti konexinu 43 (Cx43). A nakonec zjistit jejich antioxidační kapacitu stanovením hladiny MnSOD a ALDH2.

2. Literární přehled

2.1. Srdce a jeho zdroje energie

Srdce je pumpou, která přeměňuje chemickou energii v mechanickou práci. Během průměrného lidského života, kdy srdce bije rychlostí 72 úderů za minutu, dojde k ~ 2,5 bilionům srdečních kontrakcí (Hoppel et al., 2009). Srdce je složeno zejména ze srdečních svalových vláken protkaných krevními cévami. Každé z těchto vláken se skládá z několika srdečních buněk (kardiomyocytů), které jsou navzájem propojeny interkalárními disky a tvoří tak funkční sincitium síní a komor. Charakteristickou složkou kardiomyocytů je jejich kontraktilní aparát. Je tvořen myofibrilami, jejichž základními jednotkami jsou sarkomery tvořené aktiniovými a myozinovými vlákny. Tato vlákna se vzájemně překrývají a při svalovém stahu se do sebe zasouvají (Staněk, 2002). Pro svalový stah potřebuje srdeční sval velké množství energie ve formě ATP a ta je vytvářena oxidací sloučenin uhlíku a kyslíku. 60-80 % získané energie ve zdravém srdci pochází z oxidace mastných kyselin, dále pak z glukózy a laktátu. Substráty jsou k srdci přiváděny krevním oběhem a dále vstupují do oxidativního metabolismu kardiomyocytů. Tam je tvořeno ATP především uvnitř srdečních mitochondrií v procesu oxidativní fosforylace (Staněk, 2002; Solaini a Harris, 2005). Asi 2/3 vytvořeného ATP jsou využity srdečním kontraktilním aparátem a zbytek pumpami, jako jsou sarkolemální Na^+/K^+ -ATPáza nebo Ca^+ -ATPáza v membráně sarkoplazmatického retikula, které udržují iontovou rovnováhu v buňce (Solaini a Harris, 2005). Přibližně 90 % spotřeby kyslíku připadá na svalovou kontrakci, jejímž mediátorem je Ca^{2+} . Srdce je navíc vybaveno speciálním systémem buněk, které vytvářejí elektrické vzruchy a rozvádějí je po kontraktilních vláknech myokardu (Staněk, 2002).

2.1.1. Mitochondrie

Mitochondrie jsou buněčné organely, jejichž vznik vysvětluje tzv. endosymbiotická teorie. Ta říká, že byla dávnou eukaryotní buňkou pohlcena bakterie a vznikl mezi nimi endosymbiotický vztah. Tento fakt je podpořen tím, že mitochondrie obsahují svou vlastní DNA, RNA a mají svůj translační aparát. Mohou tak syntetizovat některé ze svých proteinů (Scheffler, 2008).

Mitochondrie jsou obklopeny dvěma membránami, které se liší svým složením a funkcí. Vnější membrána je díky porinům částečně propustná na rozdíl od vnitřní membrány, která je pro molekuly téměř nepropustná. Plocha vnitřní membrány je zvětšena díky záhybům nazývaným kristy, jsou zde umístěny proteiny elektrontransportního řetězce (ETC) a je místem oxidativní fosforylace. Mezi oběma membránami je mezimembránový prostor a uvnitř mitochondrií je prostor nazývaný matrix, v němž probíhá řada reakcí esenciálních pro život. Je vyplněn koncentrovanou směsí enzymů včetně těch, které se účastní metabolismu cukrů a mastných kyselin. Dochází zde k replikaci a transkripci mitochondriální DNA a translaci proteinů (McBride et al., 2006; Scheffler, 2008).

Kromě klíčové role v bioenergetice hrají mitochondrie důležitou roli také při regulaci apoptózy (Kroemer, 2003; Suen et al., 2008) a jsou hlavním zdrojem ROS (Judge a Leeuwenburgh, 2007), které jsou produkovány především komplexy I a III ETC ve formě O_2^- (Chen et al., 2003).

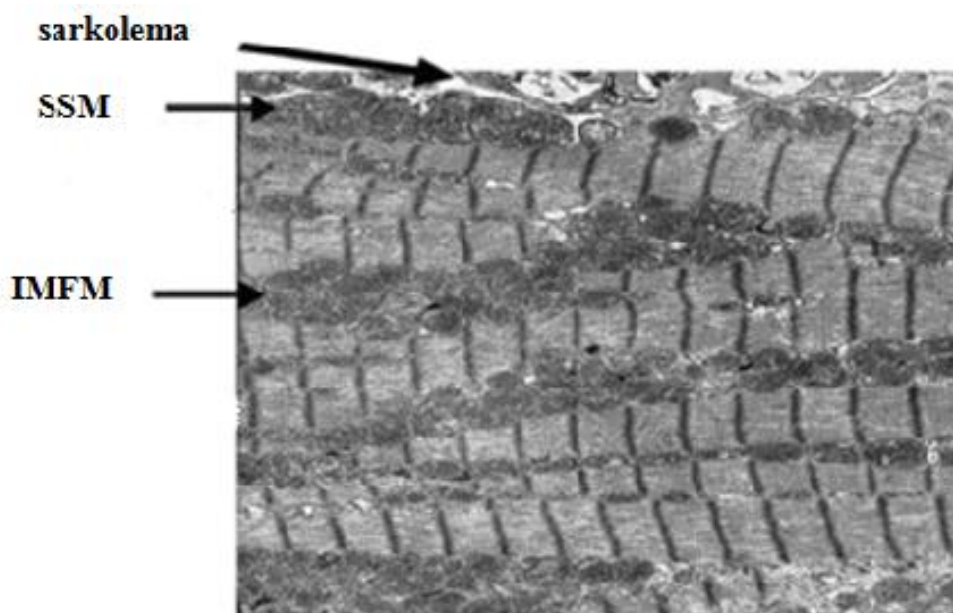
Mitochondrie jsou velmi pohyblivé organely, které neustále mění svůj tvar a polohu, štěpí se a fúzí. Můžeme tak pozorovat jejich propojenou dynamickou síť (Suen et al., 2008). Navíc se mitochondrie liší svým složením a morfologií mezi různými typy organismů, buněk a tkání (Scheffler, 2008).

Změny v morfologii mitochondrií byly pozorovány u řady srdečních chorob. Malé neuspořádané mitochondrie se vyskytují například u dilatační kardiomyopatie a hibernace myokardu. Obrovské mitochondrie byly naopak pozorovány u pacientů s diagnostikovanou mitochondriální kardiomyopatií (Ong a Hausenloy, 2010).

2.1.2. Subpopulace srdečních mitochondrií

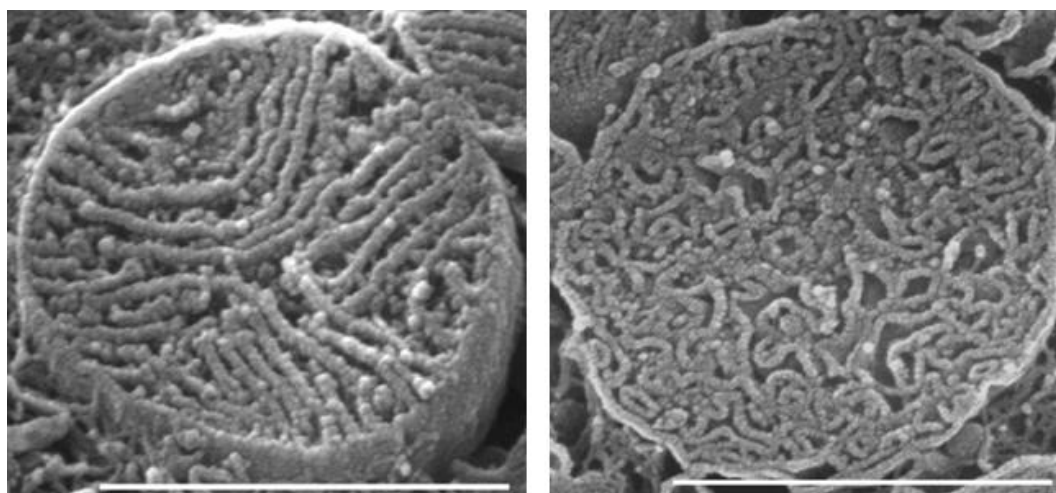
Vzhledem k požadavku srdce na velké množství energie pro svalový stah, představují mitochondrie až 50 % objemu kardiomyocytu (Staněk, 2002).

V kardiomyocytech byly pozorovány dvě subpopulace mitochondrií (viz obrázek 2.1), které se liší svou lokalizací v buňce. Subsarkolemální mitochondrie (SSM) se vyskytují přímo pod sarkolemou a intermyofibrilární mitochondrie (IMFM) se rozprostírají mezi myofibrilami kontraktilního aparátu (Palmer et al., 1977). SSM jsou pravděpodobně zdrojem energie především pro regulaci iontového transportu přes sarkolemu (Sasaki et al., 2001) a IMFM dodávají ATP především pro svalový stah (Fannin et al., 1999). Některé práce zmiňují také perinukleární mitochondrie, které obklopují buněčné jádro (Shimada et al., 1984; Ong a Hausenloy, 2010).



Obrázek 2.1 – Elektronoptický snímek kardiomyocytu potkana Fischer 344. Jsou zde vidět subpopulace mitochondrií lišící se lokalizací v kardiomyocytu. Subsarkolemální mitochondrie (SSM) jsou lokalizovány těsně pod sarkolemou. Intermyofibrilární mitochondrie (IMFM) se vyskytují mezi myofibrilami (převzato od Lesnefsky a Hoppel, 2003).

Subpopulace mitochondrií v kardiomyocytech se odlišují také po biochemické (Palmer et al., 1977; Hoppel et al., 1982; Palmer et al., 1985; Chemnitius et al., 1993; Riva et al., 2005) a morfologické stránce (Riva et al., 2005). Bylo pozorováno, že SSM mají převážně lamelifornní kristy, zatímco u IMFM převažují tubulární kristy (viz obrázek 2.2; Riva et al., 2005; Hoppel et al., 2009).



Obrázek 2.2 Snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu. Mitochondrie izolované z myokardu potkana. Subsarkolemní mitochondrie s lamelifornními kristami (snímek nalevo) a intermyofibrilární mitochondrie s tubulárními kristami (snímek napravo, převzato od Hoppel et al., 2009).

Co se týče rozdílného složení mitochondriálních membrán mezi SSM a IMFM, zatímco obě subpopulace obsahují sfingomyelin, SSM mají ve vnitřní mitochondriální membráně třikrát více ceramidu (N-acylsfingozinu) než IMFM. Ceramid je pravděpodobně zahrnut v odlišných funkčních vlastnostech obou mitochondriálních subpopulací (Monette et al., 2010). Tento lipid se uplatňuje při diferenciaci a zastavení růstu buněk a je považován za nedílnou součást iniciace apoptózy (Hannun a Obeid, 2002). Naopak IMFM obsahují oproti SSM výrazně větší množství proteinu mitofilinu, který kontroluje organizaci krist a účastní se importu proteinů udržujících strukturu mitochondrií (Ferreira et al., 2012). Také bylo pozorováno, že IMFM na rozdíl od SSM neobsahují Cx43 (Boengler et al., 2009), který je v mitochondriích detekován především ve vnitřní mitochondriální membráně (Rodriguez-Sinovas et al., 2006; Boengler et al., 2005) a jeho C-konec v SSM směřuje dovnitř intermembránového prostoru (Boengler et al., 2009).

Velká část biochemických pokusů byla prováděna na mitochondriích izolovaných ze srdcí potkanů. Bylo pozorováno, že IMFM mají vyšší aktivity citrátsyntázy (CS) a sukcinátdehydrogenázy (SDH; Palmer et al., 1977) a oxidují substráty rychleji než SSM (Palmer et al., 1977; Riva et al., 2005). Aktivity komplexů I, II a III ETC jsou vyšší u IMFM oproti SSM (Palmer et al., 1985). U IMFM byla také naměřena vyšší aktivita ATP syntázy, tedy vyšší schopnost produkce ATP, než u SSM (Ferreira et al., 2012).

Rozdílné aktivity enzymů u obou subpopulací naměřili Hoppel *et al.* u Sirských křečků. Například karnitinpalmitoyltransferáza a acyl-CoA dehydrogenáza měly vyšší aktivitu u SSM, zatímco aktivity CS a SDH byly u obou populací stejné. Ve shodě s předchozími výsledky naměřili u IMFM rychlejší oxidaci substrátů než u SSM. IMFM u stejných křečků, ale trpících kardiomyopatií, měli nižší oxidativní fosforylaci než SSM (Hoppel et al., 1982).

Jedním z adaptačních procesů, který je kardioprotektivní vzhledem k IR poškození je vytrvalostní cvičení. Ukázalo se, že cvičení má v mnoha ohledech odlišný vliv na obě mitochondriální subpopulace. Mnohé práce ukázaly, že vytrvalostní cvičení redukuje produkci volných radikálů (Judge et al., 2005a; Starnes et al., 2007) a zvyšuje proteinové hladiny primárních antioxidačních enzymů (Kavazis et al., 2008). Na druhou stranu existují práce, které po cvičení žádné změny v hladině antioxidačních enzymů v srdci nezaznamenaly (shrnutí v Kavazis, 2009). Například u cvičících potkanů, kde byla produkce peroxidu vodíku (H_2O_2) u SSM i IMFM nižší oproti kontrolám, klesla aktivita MnSOD, což může být odpovědí na nižší produkci $O_2^{\cdot -}$ (Judge et al., 2005a).

Kavazis *et al.* sledovali u dospělých potkanů hladiny antiapoptotických enzymů, včetně represoru apoptózy s prokaspázu vazebnou doménou a indukibilního proteinu tepelného šoku 70 a zjistili, že po vytrvalostním cvičení došlo k jejich zvýšení. Prokázali, že IMFM jsou citlivější k působení ROS a jimi indukované apoptóze než je tomu u SSM, ale že vytrvalé cvičení snižuje tuto citlivost u obou subpopulací mitochondrií (Kavazis et al., 2008). V další své práci se autoři zaměřili na změny hladin některých proteinů, které by mohly souviset s kardioprotekcí indukovanou vytrvalostním cvičením. Ukázali, že u obou subpopulací mitochondrií dochází k signifikantnímu poklesu hladin MAO-A proteinu, který je zahrnut v oxidativní deaminaci biogenních aminů. U SSM zaznamenali po cvičení zvýšení hladiny peroxidázy III, která likviduje H_2O_2 . Co se týče rozdílu mezi SSM a IMFM u necvičících zvířat, zaznamenali rozdíly v expresi celkem dvanácti ze zkoumaných proteinů. Tři z nich, jejichž exprese byla výrazně nižší u SSM oproti IMFM, jsou zahrnuty v ETC (Kavazis et al., 2009).

Srdeční funkce se zhoršuje s věkem, proto byla zkoumána i role mitochondriálních subpopulací v procesu stárnutí. U srdcí potkanů bylo zjištěno, že ROS produkované ETC mitochondrií způsobují se zvyšujícím se věkem oxidativní stres a narušují funkci IMFM více než SSM (Fannin et al., 1999; Suh et al., 2003; Judge et al., 2005b). Fannin *et al.* zjistili, že pokles v obsahu proteinů a oxidativní fosforylaci související se stárnutím se projevil jen u IMFM (Fannin et al., 1999). U mladých potkanů se subpopulace mitochondrií nelišily v produkci H_2O_2 (Judge et al., 2005b; Suh et al., 2003), ale u starých potkanů byla zjištěna signifikantně nižší produkce H_2O_2 u IMFM oproti SSM. S věkem produkce H_2O_2 u subpopulací mitochondrií stoupala, signifikantně však jen u SSM. Bylo také zjištěno, že s věkem výrazně klesla spotřeba kyslíku u IMFM v respiračním stavu 3 a naopak u SSM stoupla. Pokud jde o mladé potkany, byla tato spotřeba u IMFM vyšší než u SSM (Judge et al., 2005b). Suh *et al.* zaznamenali u starých potkanů zvyšující se produkci ROS u IMFM, ale ne u SSM. S věkem stoupá u IMFM množství 4-hydroxy-2-nonenalu (4HNE) navázaného na komplex IV (Suh et al., 2003) a dochází k poklesu aktivity komplexu IV. To se neděje u SSM (Fannin et al., 1999). Naopak Hofer *et al.* zjistili, že se s věkem produkce H_2O_2 u potkanů nezvyšuje a spotřeba kyslíku signifikantně neklesá u žádné ze subpopulací mitochondrií. U IMFM však dochází v průběhu stárnutí ke zvyšování citlivosti vůči Ca^{2+} indukovanému otevírání mitochondriálních permeabilních tranzitních pórů (MPTP) a zvýšení množství indikátorů apoptózy kaspáz a cytochromu c. Naopak retenční kapacita Ca^{2+} u SSM nebyla v souvislosti s věkem nijak ovlivněna. Co se týče rozdílu mezi subpopulacemi, SSM byly oproti IMFM mnohem citlivější k Ca^{2+} indukovanému otevírání MPTP (Hofer et al., 2009).

V souvislosti se stárnutím bylo také ukázáno, že u IMFM starých potkanů, ve srovnání s mladšími potkany, dochází k poklesu aktivity karnitinpalmitoyltransferázy 1, enzymu kontrolujícího rychlost transportu acyl-CoA mastných kyselin směřujících do β -oxidace v mitochondriích. U SSM nedochází při stárnutí k žádným změnám (Gomez et al., 2012).

Podobně jako u stárnutí dochází ke změnám mitochondrií během ischemie/reperfúze. Lidské srdce odpovídá na ischemii celou řadou degenerativních událostí a některé z nich zahrnují mitochondrie, což nakonec vede k buněčné smrti apoptózou nebo nekrózou (Ong a Hausenloy, 2010). Ischemické poškození ETC zvyšuje celkovou produkci H_2O_2 z komplexů I a III (Chen et al., 2008a). Srdeční ischemie snižuje aktivitu těchto komplexů (Chen et al., 2006b; Chen et al., 2008a; Lesnefsky et al., 2001a), obsah cytochromu c a respiraci u SSM i IMFM (Chen et al., 2006b; Lesnefsky et al., 2001a). Ve srovnání se srdci dospělých potkanů, srdce starého potkana utrpí větší IR poškození. Ischemické defekty na komplexech III a IV se sčítají s defekty těchto komplexů způsobených stárnutím. K poškození ischemií

došlo u obou subpopulací mitochondrií a pokles rychlosti oxidativní fosforylace byl podobný u srdcí dospělých i starých potkanů (Lesnefsky et al., 2001a).

Reverzibilní blokace ETC amobarbitalem (inhibitor komplexu I) před ischemií chrání mitochondrie před IR poškozením, brání poklesu cytochromu c a uvolňování H_2O_2 při reperfúzi u SSM i IMFM. Zlepšuje se také návrat kontraktilní funkce myokardu a značně se zmenšuje velikost infarktu (Chen et al., 2006a). Reverzibilní blokace amobarbitalem chrání před poškozením oxidativní fosforylace u obou subpopulací mitochondrií (Chen et al., 2006b).

2.1.3. Metodické přístupy při izolaci subpopulací mitochondrií

Bylo publikováno mnoho postupů izolace subpopulací mitochondrií. SSM se získají již po počáteční homogenizaci tkáně, ale pro uvolnění IMFM je nezbytné rozvolnit myofibrily krátkou expozicí proteáze, jako je například bakteriální proteáza nagaráza (Palmer et al., 1977). V případě, že byl místo nagarzy použit trypsin (Chen et al., 2006a; Chen et al., 2006b), výtěžek proteinů a rychlost oxidační fosforylace u IMFM byla podobná v obou případech (Fannin et al., 1999). V některých pracích byla pro izolaci srdečních mitochondrií používána jen samotná homogenizace tkáně, kdy takto izolované mitochondrie pravděpodobně představují především SSM frakci (Pecinová et al., 2011). Další možností izolace srdečních mitochondrií je homogenizaci srdeční tkáně po jejím vystavení proteáze, čímž je získána směs obou mitochondriálních subpopulací (Sato et al., 1995). Následkem používání odlišných metod izolace mitochondrií jsou určité rozpory výsledků některých laboratoří zkoumajících stejnou problematiku. Postupy se odlišují také způsobem homogenizace srdeční tkáně, některé laboratoře používají polytron (Kavazis et al., 2008), jiné skleněný Potter-Elvehjem homogenizátor (Hofer et al., 2009; Boengler et al., 2009) nebo kombinaci obojího (Palmer et al., 1977). Nejběžněji je k izolaci frakcí mitochondrií používána diferenciální centrifugace (Palmer et al., 1977; Kavazis et al., 2008), ale některé laboratoře používají k izolaci metodu hustotního gradientu na Percollu po tom, co byl homogenát ošetřen proteázou (Chemnitius et al., 1993; Ferreira et al., 2012).

Bylo zjištěno, že pokud jsou mitochondrie izolovány, uchovávají si své základní vlastnosti. Izolované mitochondrie mají sice tendenci k vytváření globulárního tvaru, pozice krist však zůstává převážně nezměněna (Hoppel et al., 2009; Riva et al., 2005).

2.2. Protekce ischemického myokardu

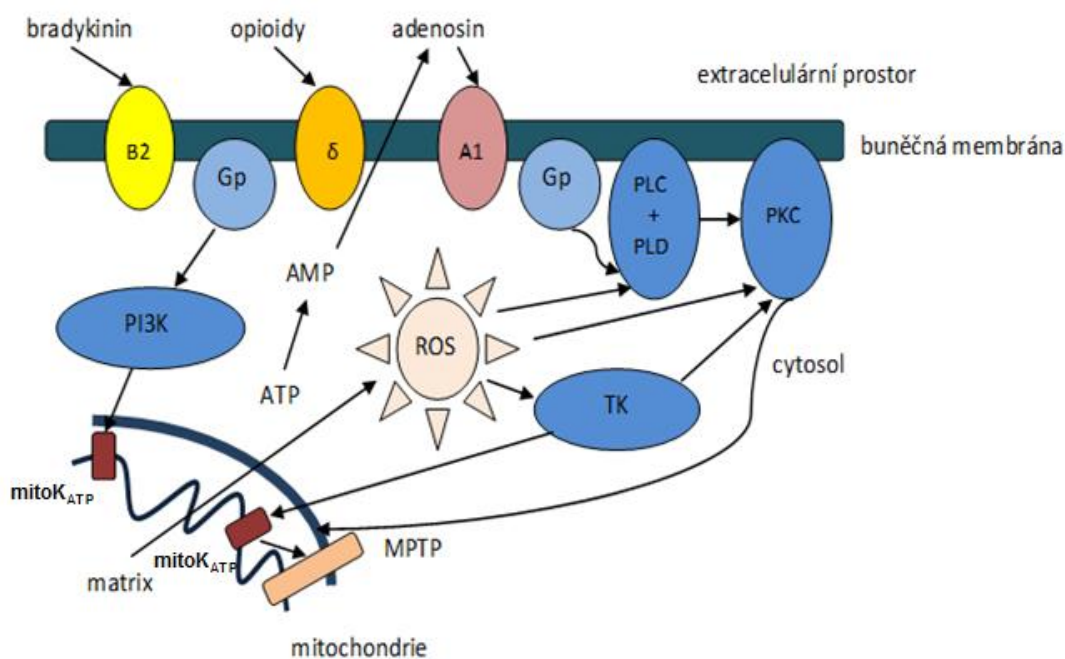
2.2.1. Ischémie

Ischémie je patologický stav, kdy dochází k nedostatečnému přívodu kyslíku do tkáně a nedostatečnému odplavování metabolitů v důsledku přerušení krevního toku do tkáně nebo orgánu, což vede k jejímu poškození nebo odumření. Tím se ischémie liší od hypoxie, která představuje snížený přívod kyslíku do tkání při adekvátní perfúzi. Příčinou poruchy koronárního průtoku je z 99 % koronární ateroskleróza a trombóza. Průvodními jevy ischémie jsou změny v mechanické práci a elektrické srdeční aktivitě, reakce autonomního nervstva, ischemická bolest a celková stresová reakce. Dochází k řadě strukturálních, funkčních a metabolických změn (Staněk, 2002). Poruší se funkce ETC a zvyšuje se také produkce ROS. Dojde ke snížení produkce ATP, čímž se naruší funkce sarkolemální Na^+/K^+ -ATPázy a Ca^{2+} -ATPázy sarkoplazmatického retikula. Díky zvýšení H^+ při probíhající anaerobní glykolýze, dochází k intracelulární acidóze. Vzhledem k nefunkčnosti ATPáz dojde k Na^+ přetížení uvnitř buněk, které obrátí $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměník. Výsledkem je intracelulární přetížení Ca^{2+} (Williams a Marber, 2010).

Ischémie může být krátkodobá a reverzibilní, ale po určité době dochází k ireversibilnímu poškození buněk. Pak po obnovení průtoku neprobíhá oxidační fosforylace, buňky umírají a dochází k ischemické nekróze, která je označována jako infarkt myokardu (Staněk, 2002). Reperfúze, která je v medicíně používána jako faktor snižující velikost infarktu, zároveň zhoršuje poškození myokardu, který je již změněn předcházející ischemií (Williams a Marber, 2010). Během prvních minut reperfúze se jako odpověď na zvýšenou tvorbu ROS, Ca^{2+} přetížení a obnovu normálního pH otvírá MPTP kanál, který rozpážením oxidativní fosforylace způsobí buněčnou smrt a indukuje bobtnání mitochondrií (Yellon a Hausenloy, 2007). Hlavním zdrojem ROS v průběhu reperfúze po dlouhotrvající ischemii jsou však neutrofily, které se nahromadily v místě poškození tkáně (Duilio et al., 2001).

2.2.2. Možnosti jak vyvolat endogenní kardioprotekci

Je několik možností, jak vyvolat kardioprotekci. Jednou z nich je tzv. ischemický preconditioning, který byl objeven v 2. polovině 80. let 20. století. Jde o krátké cykly ischemie oddělené fází perfúze před následujícím větším ischemickým atakem, které omezují rozsah infarktu (Murry et al., 1986) a zpomalují metabolismus myokardu (Murry et al., 1990). Tato protekce má krátkodobý efekt, trvá hodiny až dny (Bolli, 2000). Stále probíhá výzkum na objasnění mechanismů ischemického preconditioningu. Je známo, že se zde uplatňují příslušné receptorové systémy a signální dráhy, kterých se účastní například proteinkináza C (PKC; Speechly-Dick et al., 1994), mitochondriální na ATP závislé draslíkové kanály ($\text{mitoK}_{\text{ATP}}$) a ROS (obrázek 2.3; Yellon a Downey, 2003).



Obrázek 2.3 Navržené schéma pro klasický ischemický preconditioning. Tři receptory spouští protekci. Receptory delta opioid a bradykinin B₂ jsou spojeny s proteinkinázou C (PKC) a paralelní tyrozinkinázou (TK) skrze fosfatidilinzitol-3-kinázu (PI3K), mitochondriální na ATP závislé draslíkové kanály ($\text{mitoK}_{\text{ATP}}$) a reaktivní kyslíkové molekuly (ROS), zatímco adenosinové A₁ receptory jsou propojeny přímo s PKC. Kinázy poté působí na konečný efektor, možná K_{ATP} sám, aby se zabránilo otevření mitochondriálních permeabilních tranzitních pórů (MPTP). Gp – trimerní G proteiny, PLC – fosfolipáza C, PLD – fosfolipáza D (převzato a upraveno podle Yellon a Downey, 2003).

Preconditioning je také možné stimulovat řadou farmakologických látek, jako jsou například opioidy, adenosin, ethanol a bradikinin (Yellon a Downey, 2003). Kardioprotekci také indukuje přírodní fenol resveratrol, který je obsažen například v červeném víně a v grepech (Wu a Hsieh, 2011).

V nedávné době se také objevil nový způsob kardioprotekce zvaný postconditioning, kdy jsou krátké periody ischemie a reperfúze aplikovány simultánně se začátkem reperfúze a dochází tak k redukci reperfúzního poškození (Zhao et al., 2003; Williams a Marber 2010). Bylo zjištěno, že postconditioning je stejně efektivní v redukci velikosti infarktu jako postconditioning (Zhao et al., 2003).

Další možností indukce kardioprotekce je adaptace na chronickou hypoxii, která pravděpodobně využívá v buňkách podobné mechanismy jako ischemický preconditioning (Neckář et al., 2002). Hypoxie je definována jako výsledek nerovnováhy mezi množstvím kyslíku dodávaného a množstvím kyslíku, které buňka skutečně potřebuje (Ošťádal, 2002). Chronická hypoxie může mít několik příčin vzniku, podle nichž se dělí na (Ošťádal a Kolař, 2007):

- **ischemická hypoxie (cirkulační)** – nedostatečný průtok krve kapilárami nebo jeho přerušením
- **systémová hypoxie** – pokles parciálního tlaku kyslíku v arteriální krvi (například hypoxie vyvolaná vysokou nadmořskou výškou)
- **anemická hypoxie** – arteriální tlak kyslíku je v pořádku, ale je snížena schopnost krve kyslík transportovat

Existují jen dva případy, kdy je systémová hypoxie považována za fyziologickou, a to je u fetálního myokardu, kdy hypoxie odpovídá nadmořské výšce 8000 m anebo u lidí, kteří neustále žijí ve vysoké nadmořské výšce. V obou situacích je myokard rezistentní vůči akutnímu nedostatku kyslíku. Po narození se u lidí žijících v nízké nadmořské výšce protekce ztrácí (Ošťádal, 2002; Ošťádal a Kolář, 2007).

Již v 50. letech 20. století byl pozorován nižší výskyt infarktu myokardu u lidí žijících v Peru ve vysoké nadmořské výšce (Hurtado, 1960). K první experimentální studii došlo v Praze, v roce 1958 a byla provedena Kopeckým a Daumem. Použili model vysoké nadmořské výšky stimulovaný v hypobarické komoře. Zjistili, že pravá komora (RV) srdeční izolovaná z potkana aklimatizovaná každý druhý den po dobu šesti týdnů na nadmořskou

výšku 7000 m, obnovuje kontraktilitu po periodě akutní anoxie lépe než je tomu u kontrolních zvířat (Kopecký a Daum, 1958). Později bylo zjištěno, že protektivní vliv má i intermitentní chronická hypoxie relativně krátkého trvání a to 4 h denně, celkem 24 expozic (McGrath et al., 1973; Widimský et al., 1973).

Epidemiologické výzkumy z Nového Mexika ukázaly, že i nižší nadmořská výška má kardioprotektivní účinky. U lidí žijících v nižší nadmořské výšce okolo 2100 m byla pozorována vyšší odolnost vůči ischemickým srdečním chorobám (Mortimer et al., 1977), ale odolnost kardiopulmonárního systému je ovlivněna již v nadmořské výšce 1,350 m (Kolář et al., 1988).

Chronická hypoxie redukuje negativní projevy IR poškození, kterými jsou velikost infarktu, postischemická kontraktilní disfunkce a srdeční arytmie (Ošťádal a Kolář, 2007).

Adaptace na chronickou hypoxii ve vysoké nadmořské výšce způsobuje řadu funkčních a strukturálních změn vedoucích k zachování homeostázy. Výraznou adaptační změnou je zvýšená koncentrace hemoglobinu, tedy zlepšení transportu kyslíku krví. Někdy je také pozorována zvýšená kapilarizace. Kompenzačními mechanismy jsou také koronární angiogeneze a vzestup koronárního průtoku (Ošťádal, 2002). Dochází také k zvýšení množství erytrocytů v krvi (polycystémie; Kasalický et al., 1977). Naopak zvýšení krevní viskozity srdce zatěžuje (Ošťádal a Kolář, 2007).

Adaptace na vysokou nadmořskou výšku vede ke změnám plic. Zlepšuje se jejich difúzní kapacita skrze zvýšení množství hemoglobinu, objemu alveol a membránové difúzi (Agostoni et al., 2011).

Co se týče energetického metabolismu srdečního svalu, stoupá kapacita anaerobního metabolismu a také se zvyšuje počet mitochondrií při současném zmenšení jejich objemu (Ošťádal, 2002). Klesá schopnost myokardu využít a oxidovat mastné kyseliny snížením aktivit klíčových enzymů metabolismu tuků - karnitin palmitoyltransferázy-I (Kennedy et al., 2001) a 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy (Bass et al., 1989; Kennedy et al., 2001). Naopak je více využívána glukóza a laktát (Essop, 2007). Adaptace na úrovni sarkolemálních enzymů umožňuje účinnější využití ATP a brání poruchám v transportní funkci membrán. Dochází tak k ochraně myokardu při snížené produkci ATP (Ošťádal, 2002).

Chronická hypoxie stimuluje sympatický nervový systém. Snižuje se hustota β -adrenergických receptorů, což má antiarytmický efekt (Ošťádal, 2002).

Adaptace na chronickou hypoxii má také negativní účinky. Je známo, že lidé dlouhodobě žijící ve vysoké nadmořské výšce mají rozvinutou plicní hypertenzi a hypertrofii RV srdeční (Rotta et al., 1956). Podobně adaptace na chronickou hypoxii ve vysoké

nadmořské výšce také způsobuje vznik plicní hypertenze, která vede ke vzniku hypertrofie RV (Kolář et al., 1989; Morel et al., 2003; Ošťádal, 2002). Tato adaptace umožní pravé komoře vyrovnání se zvýšenými pracovními nároky a udržení minutového výdeje, ale po delším působení hypoxie může dojít k srdečnímu selhání (Ošťádal, 2002). U potkanů adaptovaných na intermitentní chronickou hypoxii ve vysoké nadmořské výšce (IHA) byly pozorovány morfologické změny v myokardu včetně drobných nekrotických ložisek v RV (Urbanová et al., 1977).

Zvýšená odolnost srdečního svalu k akutnímu nedostatku kyslíku jako pozitivní následek adaptačního procesu přetrvává v experimentálních podmínkách ještě 4 měsíce po skončení adaptace. Ke kontrolním hodnotám se po určité době v normoxických podmínkách vracejí i závažnější změny, jako jsou plicní hypertenze, hypertrofie RV, polycystémie, metabolické změny a snížená tělesná hmotnost. Hodnoty hemoglobinu a hmotnost pravé komory srdeční se vracejí k normě již 14 dní po ukončení adaptace (Ošťádal, 2002).

Jsou již známy některé molekulární mechanismy kardioprotekce, kterými IHA chrání kardiomyocyty před IR poškozením. Aktivují se některé signální dráhy a exprimují proteiny. Dochází například ke změnám v homeostáze a koncentraci Ca^{2+} . IHA chrání srdce před letálním přetížením buněk Ca^{2+} (Zhu et al., 2003; Xie et al., 2004; Chen et al., 2006c) a zmírňuje ischemií/reperfúzí způsobené snižování obsahu proteinů sarcomplazmatického retikula, jako jsou Ca^{2+} ATPázy a ryanodinový receptor (RyR). Navíc chrání aktivitu $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměňkového mechanismu (NCX) v průběhu ischemie/reperfúze. (Chen et al., 2006c). Bylo také pozorováno, že adaptace na IHA zvyšuje aktivity RyR a NCX v průběhu ischemie/reperfúze. Toto zvýšení aktivit bylo zrušeno inhibitory PKC a proteinkinázy A (PKA), což poukazuje na aktivační funkci těchto kináz (Yeung et al., 2007). Zhu *et al.* ukázali, že chronická hypoxie chrání proti přetížení buněk Ca^{2+} zpomalí otevírání MPTP a uvolňování cytochromu c z mitochondrií (Zhu et al., 2006). Další molekulou s pravděpodobným uplatněním v kardioprotektivním působení chronické hypoxie je oxid dusnatý (NO; Ošťádalová et al., 2002).

Experiment, ve kterém byl použit inhibitor MCC-134 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$, ukázal, že tento kanál hraje zásadní roli v protekci potkaního srdce navozené IHA (Kolář et al., 2005). Také blokátor $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ 5-hydroxydecanoát ruší zlepšení postischemického zotavení kontraktility a redukcí velikosti infarktu u IHA zvířat, ale nemá vliv na normoxickou skupinu. Naopak látky otevírající $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ jako je diazoxid a BMS-191095, sníží disfunkci kontrakce a velikost infarktu u normoxických srdcí na úroveň hypoxických srdcí (Neckář et al., 2002). Antagonista

mitoK_{ATP} glibenclamid také ruší protektivní efekt IHA (Zhu et al., 2003). Aktivace mitoK_{ATP} je pravděpodobně také součástí protekce navozené IHA proti arytmiím (Asemu et al., 1999).

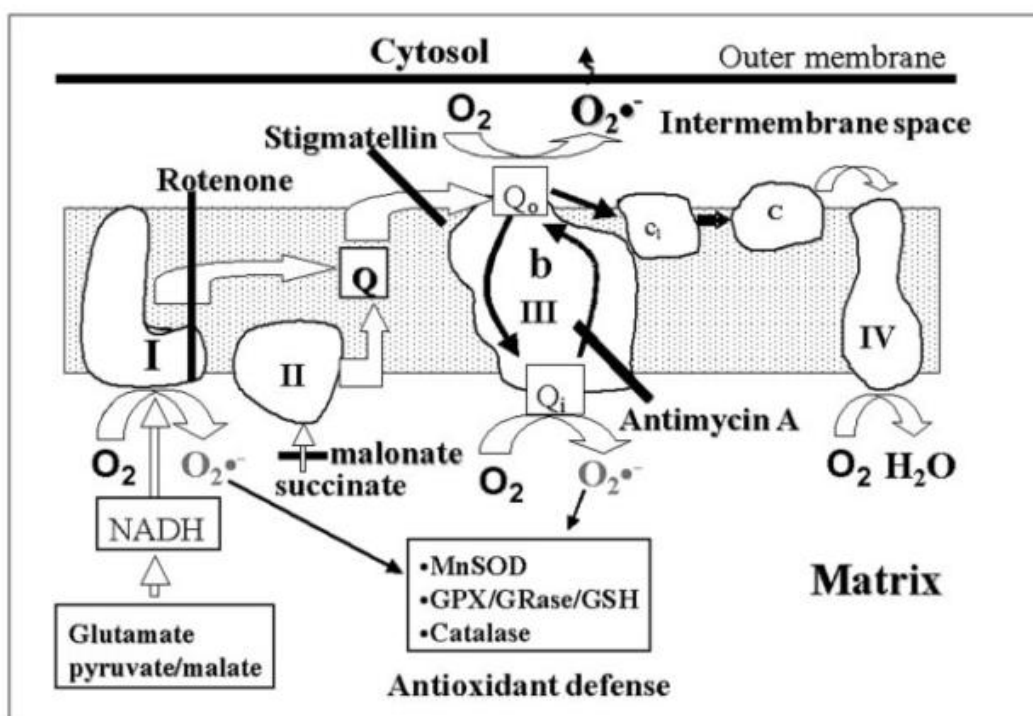
Ukázalo se, že signálních drah kardioprotekce navozené IHA se účastní řada proteinkináz. Patří mezi ně PKC a pravděpodobně i fosfatidilinositol-3-kináza (PI3K) (Ravingerová et al., 2007). PKC má po adaptaci na IHA zvýšenou expresi a je permanentně aktivována (Morel et al., 2003; Ding et al., 2004). Konkrétně IHA zvyšuje expresi PKC- δ (Neckář et al., 2005; Hlaváčková et al., 2010). Bylo zjištěno, že antioxidant N-acetylcystein podávaný preventivně chronicky hypoxickým potkanům zrušil kardioprotekci a eliminoval upregulaci PKC- δ . Zvýšená exprese PKC- δ tedy závisí na oxidačním stresu (Kolář et al., 2007), s kterým je adaptace na chronickou hypoxii spojena (Chen et al., 2005a; Kolář et al., 2007). Tedy také ROS jsou zahrnuty v protektivním mechanismu IHA (Kolář et al., 2007).

2.2.3. Reaktivní formy kyslíku

Volné radikály mohou být definovány jako molekuly nebo molekulární fragmenty obsahujících jeden nebo více nespárovaných elektronů v atomových nebo molekulových orbitalech. Takový elektron přidělí volnému radikálu značnou reaktivitu (Valko et al., 2007).

Malá množství ROS, jako je O₂⁻, H₂O₂ a hydroxylový radikál (OH[•]), jsou neustále vytvářena v aerobních organizmech jako odpověď na vnitřní i vnější stimuly. Nízké koncentrace ROS jsou nezbytné v řadě procesů zahrnujících intracelulární signalizaci a v obraně proti mikroorganismům. Naopak vysoké koncentrace ROS vedou k oxidačnímu stresu, který způsobí celou řadu metabolických malformací a poškozuje biomolekuly (Matés a Sánchez-Jiménez, 1999). Nejreaktivnějším z radikálů je OH[•], je zodpovědný za většinu poškozených biomolekul (Scheffler 2008).

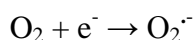
Největší množství ROS je produkováno v mitochondriích jako vedlejší produkt respirace. Počáteční O₂⁻ je tvořen zejména v komplexech I a III dýchacího řetězce (viz obrázek 2.4; Chen et al., 2003, Valko et al., 2007). Malá množství jsou vytvářena i na jiných místech buňky (Scheffler 2008). Dalšími endogenními zdroji ROS jsou například reakce kyslíku na cytochromu P450, reakce zahrnující katecholaminy a xanthinoxidázy (Scheffler, 2008) a v neutrofilech tvoří O₂⁻ NAD(P)H-oxidáza (Šochman, 2002). Mezi exogenní zdroje ROS patří například UV záření, radioaktivní záření a průmyslové zplodiny.



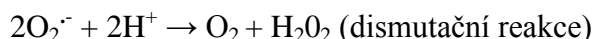
Obrázek 2.4 Schéma elektrontransportního řetězce ukazující místa produkce reaktivních kyslíkových radikálů. Komplex I (NADH dehydrogenázové místo) a Q_i místo komplexu III uvolňují reaktivní kyslíkové molekuly do matrix přímo směrem k antioxidační ochraně. Jsou zde ukázány antioxidační enzymy manganová superoxiddismutáza (MnSOD), glutathionperoxidáza (GPX) a kataláza. Naopak Q_o místo komplexu III uvolňuje reaktivní kyslíkové radikály do intermembránového prostoru pryč od antioxidační ochrany, což podporuje jejich uvolnění z mitochondrií. GRase - glutathionreduktáza, GSH - redukováný glutathion (převzato z Chen et al., 2003).

ROS jsou vytvářeny řadou reakcí (Scheffler 2008; Valko et al., 2007).

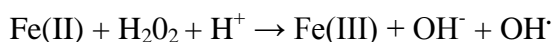
Superoxidový radikál vzniká reakcí molekulárního kyslíku s volným elektronem:



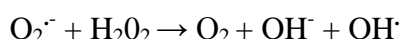
Z toho postupně vzniká OH[•] přes mezistupeň H₂O₂:



OH[•] nakonec vzniká Fentonovou reakcí:



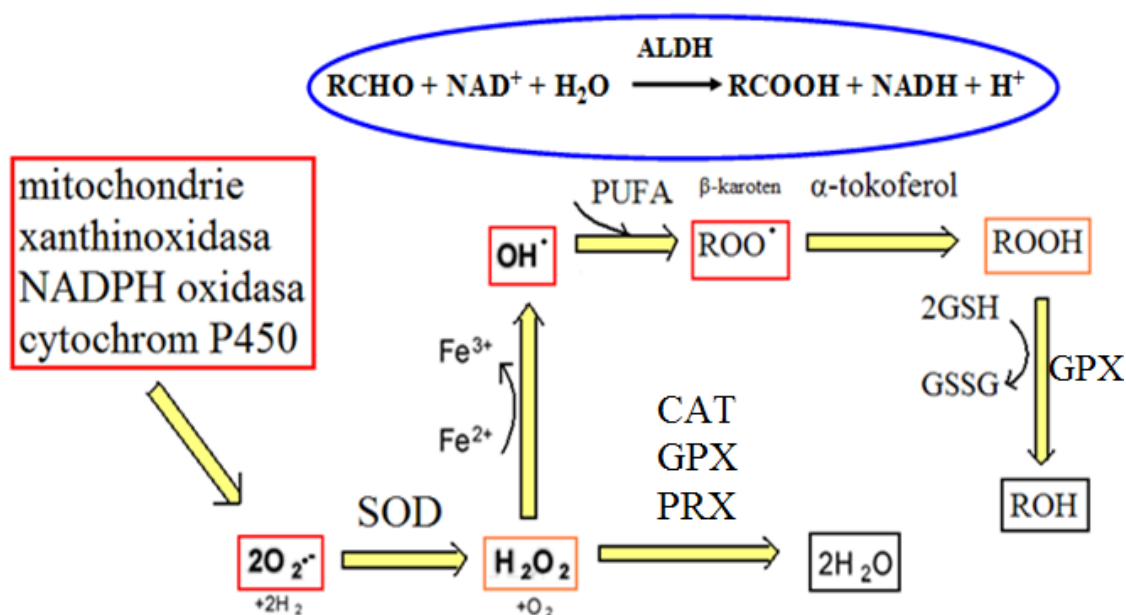
nebo také Haber-Weissovou reakcí:



2.2.4. Antioxidační enzymy

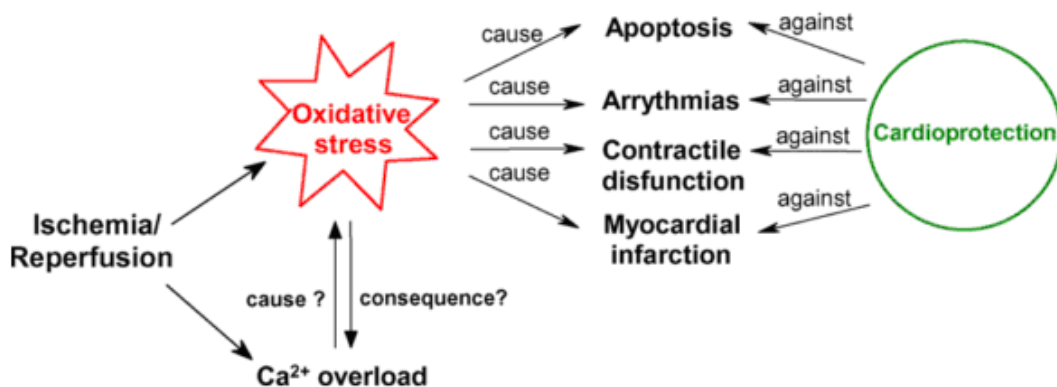
Buňky se brání oxidativnímu stresu způsobenému ROS řadou protektivních mechanismů, mezi něž patří enzymová a neenzymová antioxidační obrana (viz obrázek 2.5).

Primární enzymatické antioxidanty zahrnují superoxiddismutázu (SOD), glutathionperoxidázu (GPX) a katalázu (CAT). Neenzymatické antioxidanty jsou reprezentovány kyselinou askorbovou (vitamín C), α -tokoferolem (vitamín E), glutathionem, karotenoidy, flavonoidy atd. (Valko et al., 2007). Za normálních podmínek je udržována rovnováha mezi aktivitami a intracelulární hladinou těchto enzymů. Jejich existence je důležitá pro přežívání a dlouhověkost organismů (Valko et al., 2007; Scheffler 2008). Mezi antioxidanty můžeme zařadit i rodinu enzymů aldehyddehydrogenáz (ALDH), které odstraňují toxické aldehydy (Vasiliou a Nebert, 2005).



Obrázek 2.5 Schéma antioxidační ochrany buněk. Reakce zprostředkované antioxidačními enzymy superoxiddismutázou (SOD), katalázou (CAT), glutathionperoxidázou (GPX), peroxiredoxiny (PRX) a neenzymatickými antioxidanty α -tokoferolem a β -karotenem. V modrém oválu je znázorněna reakce zprostředkovaná aldehyddehydrogenázami (ALDH); PUFA – polynenasycené mastné kyseliny, GSH – redukovaný glutathion, GSSG – oxidovaný glutathion (převzato a upraveno podle Štípek et al., 2000).

Ke změnám v hladinách antioxidantů dochází při oxidačním stresu, který nastává například při ischemii/reperfúzi (viz kapitola 2.2.1.). Následky oxidačního stresu a antioxidační obrana při ischemii/reperfúzi jsou znázorněny na obrázku 2.6.

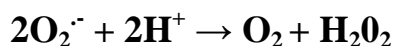


Obrázek 2.6 Efekt oxidačního stresu a patofyziologie ischemicko-reperfúzního poškození v srdci (převzato a upraveno podle Valko et al., 2007).

2.2.4.1. Manganová superoxiddismutáza

U savců existují tři formy SOD – cytozolická měď-zinková SOD (Cu,Zn-SOD; SOD1), mitochondriální manganová SOD (MnSOD; SOD2) a extracelulární SOD (EC-SOD; SOD3) (Chen et al., 1998; Matés a Sánchez-Jiménez, 1999). SOD katalizují dismutaci $O_2^{\cdot -}$ postupně oxidací a redukcí kovového iontu v aktivním místě molekuly (Matés a Sánchez-Jiménez 1999). Vzniklý H_2O_2 je poté pomocí CAT nebo GPX přeměněn na vodu a molekulární kyslík nebo z něho vznikají další agresivnější radikály.

Mitochondriální enzym MnSOD je homotetramer (96 kDa), kde každá podjednotka obsahuje manganový atom, který cykluje z Mn(III) na Mn(II) a zase zpět na Mn(III) během dvoukrokové dismutace $O_2^{\cdot -}$ (viz obrázek 2.7; Matés a Sánchez-Jiménez, 1999). Protein je syntetizován v cytoplazmě a posttranslačně transportován do mitochondriální matrix (Wispe et al., 1989).



Obrázek 2.7 Dismutační reakce zprostředkovaná MnSOD.

Nezbytnost MnSOD ukazují experimenty s MnSOD ^{-/-} myšmi. Dochází u nich k nadměrné produkci O₂⁻, a tím k poškození mitochondrií. Stav myši se zlepší až po podání EUK 189, mimetika SOD (Morten et al., 2006). U těchto myši je defekt MnSOD letální buď již v průběhu embryonálního vývoje, nebo v prvních dnech po narození, kdy trpí například kardiomyopatií (Li et al., 1995; Huang et al., 2001)

MnSOD je hlavním ochranným prostředkem buněk proti ROS vytvořených mitochondriemi a je zahrnuta v kardioprotekci indukované opakovaným fyziologickým nebo farmakologickým stresem (Hoshida et al., 2002).

V případě, kdy byla MnSOD nadměrně exprimována u transgenních myši, docházelo k protekci vůči IR poškození a byla limitována velikost infarktu. To znamená, že ROS jsou hlavní příčinou IR poškození. MnSOD také brání vzniku dalších toxických radikálů (Chen et al., 1998). U potkaních srdcí transfekovaných MnSOD genem byla nadměrně exprimována MnSOD a také se projevila zvýšená tolerance vůči IR poškození (Suzuki et al., 1999).

Hamilton *et al.* zjistili, že zvýšení MnSOD bylo v srdci potkanů indukováno cvičením (Hamilton et al., 2001). U cvičících potkanů také došlo ke zvýšení hladiny MnSOD u obou subpopulací mitochondrií, signifikantně však jen u SSM (Kavazis et al., 2008). Navíc cvičením zvýšená aktivita MnSOD hraje důležitou roli v protekci proti arytmiím srdečních komor (Hamilton et al., 2004). Z těchto a dalších výzkumů vyplývá, že je MnSOD s největší pravděpodobností součástí mechanismů kardioprotekce indukované cvičením (Hamilton et al., 2001; Hamilton et al., 2004; Kavazis et al., 2008; Powers, 2007). Yamashita *et al.* ukázali, že k aktivaci MnSOD vede produkce ROS a endogenních TNF- α a IL-1 β indukovaná cvičením (Yamashita et al., 1999). Avšak existují také práce, které došly k výsledkům, že vytrvalé cvičení nevede ke změně u MnSOD (shrnutí v Kavazis, 2009).

Také protein tepelného šoku 72 zvyšuje kardioprotekci, jejíž mechanismus je pravděpodobně spojen se zvýšením aktivity MnSOD ischemii/reperfúzi (Suzuki et al., 2002). Ischémie/reperfúze zvyšuje hladinu MnSOD v mitochondriích a snižuje uvolňování MnSOD a cytochromu c do cytozolu během ischémie/reperfúze (Jin et al., 2005).

Balková *et al.* ukázali, že adaptace dospělých potkanů na IHA signifikantně zvyšuje aktivitu a hladinu proteinu MnSOD v mitochondriích ze srdce potkana (Balková et al., 2011), ale nebyl zaznamenán vliv IHA na expresi MnSOD v homogenátu myokardu (Kolář et al., 2007). Z negativní korelace mezi zvýšenou aktivitou MnSOD v mitochondriích a snížené velikostí infarktu bylo vyvozeno, že MnSOD přispívá ke zlepšení tolerance srdcí adaptovaných na IHA vůči ischemii. Tento efekt IHA na aktivitu a množství MnSOD zmizel, když byl v průběhu adaptace podáván antioxidant N-acetylcystein. Tyto výsledky podporují

roli ROS v signalizaci navozené IHA (Balková et al., 2011). Potkani adaptovaní na IHA v průběhu časného postnatálního vývoje měli také vyšší aktivitu MnSOD v LV srdce ve srovnání s normoxickými kontrolami (Zhu et al., 2004).

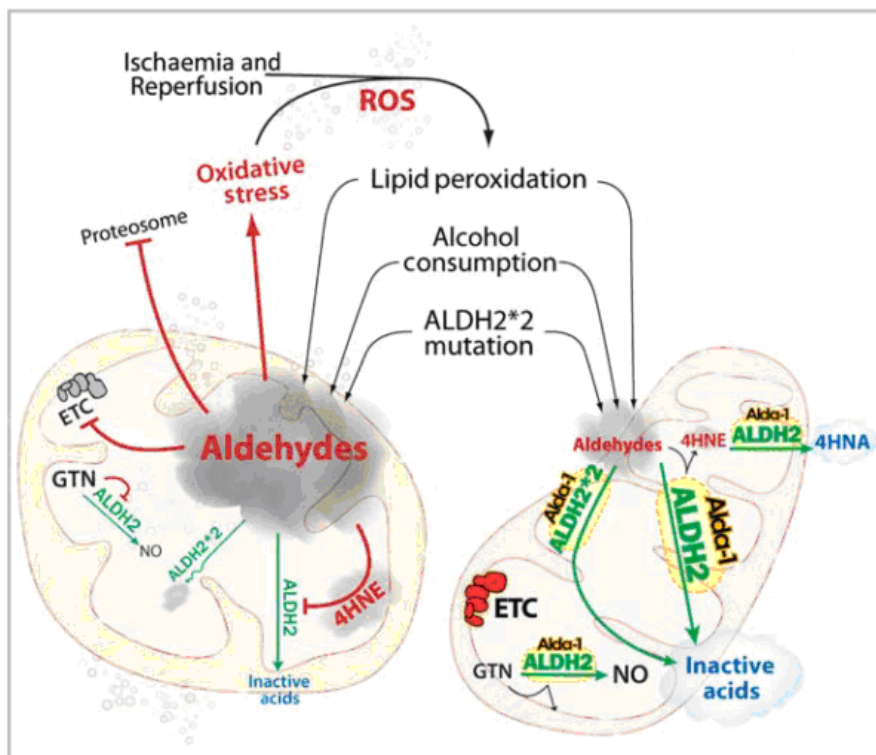
2.2.4.2. Aldehyddehydrogenáza 2

ALDH jsou enzymy eliminující toxické aldehydy oxidací na jejich méně reaktivní kyseliny v řadě orgánů a buněk. Aldehydy jsou tvořeny během řady fyziologických procesů, jako je katabolismus aminokyselin a molekul, jako je GABA, serotonin, nonadrenalin, adrenalin a dopamin. Dále vznikají v metabolismu lipidů a karbohydrátů. Kromě těchto endogenních aldehydů se hladina aldehydů vyskytuje také v životním prostředí. A to například ve smogu, cigaretovém kouři a výfukových plynech motorových vozidel. Vznikají také v řadě průmyslových procesů, jako je například produkce polyuretanu. Všechny tyto aldehydy přispívají ke vzniku kardiovaskulárních chorob (Chen et al., 2010).

Mitochondriální ALDH je ALDH2. Patří do devatenáctičlenné superrodiny genů ALDH. Izoenzymy ALDH mají odlišnou tkáňovou distribuci (Vasiliou a Nerbert, 2005). ALDH2 je tetramerní enzym exprimovaný především v plicích a játrech, ale je přítomna i v orgánech, které potřebují vysokou kapacitu mitochondrií pro tvorbu ATP, jako jsou srdce a mozek (Chen et al., 2010). Nejznámějšími reakcemi zprostředkovanými ALDH2 jsou oxidace acetaldehydu na jeho kyselinu v metabolismu etanolu (Doser et al., 2009) a detoxifikace dalších reaktivních aldehydů, jako je 4HNE (Churchill et al., 2009; Ma et al., 2011). Navíc má ALDH2 reduktázovou aktivitu, kterou katalyzuje přeměnu nitroglycerinu na 1,2-glycerildinitrát a zprostředkovává tak bioaktivaci nitroglycerinu potřebného pro produkci NO, důležitého vazodilatátoru (Chen a Stamler, 2006c; Chen et al., 2005b). Obrázek 2.8 znázorňuje poškozování mitochondrií aldehydy a jak je ALDH2 redukuje.

Bylo prokázáno, že ALDH2 hraje roli v endogenní kardioprotekci (Chen et al., 2008b; Churchill et al., 2009; Doser et al., 2009; Lagranha et al., 2010; Perlman et al., 2009; Ma et al., 2011). Aktivitu ALDH2 v ischemickém srdci zvyšuje aktivovaná PKC- ϵ (ethanolem nebo $\Psi\epsilon$ RACK) současně s redukcí velikosti infarktu (Chen et al., 2008b). Bylo zjištěno, že PKC- ϵ translokuje do mitochondrií (Churchill et al., 2009) a asociuje s ALDH2 (Chen et al., 2008b; Churchill et al., 2009). V průběhu ischemie jsou produkovány ROS (Lagranha et al., 2010; Chen et al., 2010), které vedou k lipidové peroxidaci a produkci a akumulaci řady reaktivních

aldehydů jako je acetaldehyd (Cordis et al., 1993) a 4HNE (Blasig et al., 1995). 4HNE inhibuje některé proteiny klíčové v metabolismu buňky, například glyceraldehydfosfátdehydrogenázu (Uchida a Stadtman, 1993) a dále Na^+/K^+ -ATPázu (Siems et al., 1996). Vysoká koncentrace 4HNE při ischemii ALDH2 přímo inhibuje (Chen et al., 2008b; Doorn et al., 2006). Této inhibici můžeme předejít přítomností aktivátoru ALDH2 Alda-1 (Chen et al., 2008b). Bylo také prokázáno, že ALDH2 chrání myokard proti IR poškození regulací autofágie skrze AMPK- a Akt-mTOR signalizaci. Při ischemii je stimulována autofágie spojená s AMPK aktivací a je inhibována během reperfúze aktivací Akt a mTOR (Ma et al., 2011).



Obrázek 2.8 Schéma ukazuje poškozování mitochondrií zprostředkované aldehydy a jak tyto toxické aldehydy redukuje aldehyddehydrogenáza 2 (ALDH2); Alda 1 – aktivátor ALDH, ROS – reaktivní kyslíkové molekuly, ETC – elektrontransportní řetězec, 4HNA - 4-hydroxy-2-nonenová kyselina, 4HNE – 4-hydroxy-2-nonenal, GTN – nitroglycerin (převzato a upraveno podle Chen et al., 2010).

3. Cíle diplomové práce

V rámci této diplomové práce bylo stanoveno několik cílů:

1. Zavést metodu izolace mitochondriálních subpopulací z levé komory myokardu potkana.
2. Zjistit funkční stav mitochondriálních subpopulací měřením spotřeby kyslíku.
3. Ověřit správnost izolace přítomností Cx43 (markeru SSM) u subpopulací mitochondrií.
4. Vyloučit kontaminaci frakcí plazmatickou membránou pomocí Na^+/K^+ -ATPázy.
5. Charakterizovat mitochondrie pomocí aktivit CS a SDH.
6. Stanovit expresi MnSOD, ALDH2 a Cx43 po adaptaci myokardu na chronickou hypoxii.

4. Materiál a metody

4.1. Laboratorní zvířata

K pokusům byli použiti samci potkana kmene Wistar, kteří pocházeli z chovu firmy Velaz. Všechna zvířata měla volný přístup k vodě a standardní laboratorní dietě. Studie byla vedena ve shodě s „*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” publikovaným US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

4.2. Experimentální model intermitentní výškové hypoxie

Potkani byli rozděleni do dvou experimentálních skupin:

- **intermitentní výšková hypoxie 7000 m (IHA)** – adaptace potkanů na chronickou hypoxii probíhala v hypobarické komoře 8 hodin denně, 5 dní v týdnu, v celkovém počtu 25 expozic. Barometrický tlak byl snižován postupně, aby po 13 expozicích odpovídal nadmořské výšce 7000 metrů, kde má barometrický tlak hodnotu 40,9 kPa ($p_B = 306,8$ mm Hg) a parciální tlak kyslíku hodnotu 8,5 kPa ($p_{O_2} = 63,8$ mm Hg). Během adaptace byla v komoře zajištěna cirkulace vzduchu a teplota byla udržována na 21-23 °C.
- **normoxie (Nor)** – kontrolní potkani byli drženi v nadmořské výšce 200 metrů nad mořem, čemuž odpovídá barometrický tlak 99 kPa ($p_B = 742$ mm Hg) a parciální tlak kyslíku 20,7 kPa ($p_{O_2} = 155$ mm Hg).

4.3. Odběr tkáně

Potkani byli intraperitoneálně narkotizováni pentobarbitalem sodným (Sanofi, Francie) v dávce 60 mg.kg^{-1} . Srdce bylo vystřiženo z hrudníku, propláchnuto ve vychlazeném fyziologickém roztoku a po odstranění síní a velkých cév bylo rozděleno na septum (S), pravou (RV) a levou komoru (LV). Jednotlivé části srdce byly zváženy a LV byla neprodleně použita pro izolaci subpopulací mitochondrií.

4.4. Zdroje používaných chemikálií

V tabulce 4.1 jsou uvedeny zdroje použitých chemikálií.

Tabulka 4.1 Zdroje chemikálií

ZDROJ	CHEMIKÁLIE
<i>Penta</i>	NaCl
<i>Lach-Ner</i>	methanol, HCl, KOH
<i>Lachema</i>	glycerol, H ₂ O ₂ , kyselina octová, persíran amonný, aceton
<i>Roche</i>	Protease inhibitor cocktail tablets
<i>Sigma</i>	BSA, činidlo Bradfordové, Akrylamid/bisAkryklamid, BPB, DMSO, DTT, glycin, kyselina p-kumarová, luminol, Ponceau 2S, SDS, Tween 20, mannitol, sacharóza, Tris, EGTA, EDTA, HEPES, Acetyl koenzym A, DTMB, oxalacetát, sukcinát, Triton X-100, standard molekulových hmotností, KH ₂ PO ₄ , FCCP, oligomycin, glutamát sodný, malát sodný, ADP, KCN, DCIP, KCl, MgCl ₂
<i>Bio-Rad</i>	BSA standard 2 mg/ml
<i>Fluka</i>	TEMED

Zkratky – viz seznam zkratek.

4.5. Izolace subpopulací mitochondrií z levé komory srdeční

Subpopulace mitochondrií byly izolovány pomocí diferenciální centrifugace na základě sedimentační rychlosti dané jejich velikostí podle modifikovaného postupu Kavazise *et al.* (viz obrázek 4.1; Kavazis *et al.*, 2008). Pro izolaci byly připraveny tři pufrů. Pufr 1 (0,22 M mannitol, 0,07 M sacharóza, 2 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM HEPES, 0,2 % (w/v) BSA, pH 7,2). Stejně složení jako pufr 1 měly i pufrů 2 a 3, do obou těchto pufrů ale nebylo přidáno BSA. Pufr 3 navíc obsahoval inhibitory proteáz. Izolovány byly subpopulace mitochondrií z LV potkanů chovaných v normoxických podmínkách a potkanů adaptovaných na chronickou hypoxii. Všechny kroky izolace byly prováděny na ledu nebo při teplotě cca 4 °C.

Při každé izolaci byly zpracovány tři LV z každé experimentální skupiny potkanů. Po zvážení byla tkáň rozstříhána na drobné fragmenty v malém množství pufru 1. Dále byla homogenizována ve 3 ml pufru 1 pomocí polytronu (ULTRA – TURAX T8) po dobu 3 min při 70% výkonu. Poté bylo množství pufru 1 doplněno na 10% homogenát a promícháno. Homogenát byl centrifugován (Sigma Laboratory centrifuges 3K18, rotor Sigma Nr.12158-H) 10 min při 800 x g, aby se subsarkolemální mitochondrie (SSM) oddělily od myofibril.

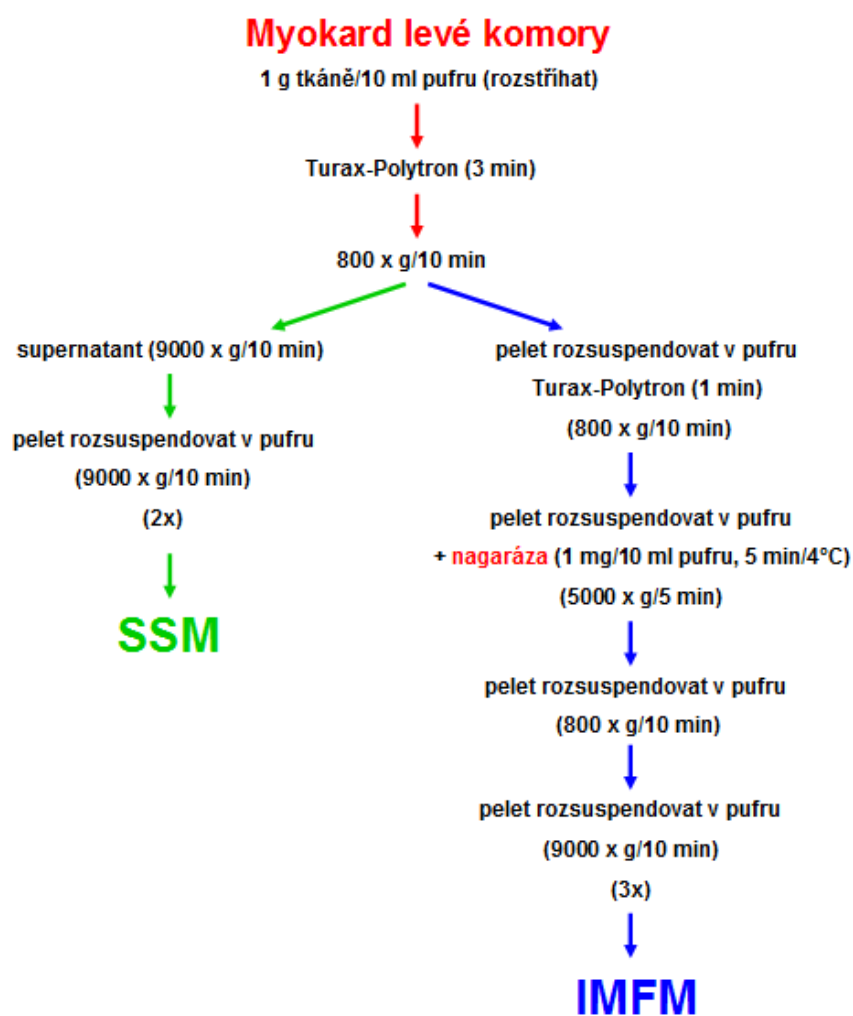
Supernatant obsahující SSM byl centrifugován 10 min při 9000 x g. Získaný pelet byl rozsuspendován v pufru 1 a centrifugován 10 min při 9000 x g. Pelet byl rozsuspendován v pufru 2 a opět centrifugován 10 min při 9000 x g. Konečný pelet SSM byl rozsuspendován ve 190 µl pufru 2 a rozdělen na dvě poloviny, přičemž do jedné z těchto polovin bylo doplněno 95 µl pufru 2 (vzorky pro měření spotřeby kyslíku a enzymových aktivit) a do druhé poloviny 95 µl pufru 3 (vzorky pro stanovení exprese proteinů).

Pelet s myofibrilami obsahujícími IMFM byl rozsuspendován v pufru 1 a znovu polytronován (60 s) a 10 min centrifugován při 800 x g. Získaný pelet byl rozsuspendován v pufru 1 s rozpuštěnou bakteriální proteázou nagarázou (1 mg nagarázy/10 ml pufru 1; Bakteriální proteáza typu XXIV, Sigma) a ponechán působení nagarázy po dobu 5 min. Reakce byla zastavena přidáním stejného množství pufru 1, v jakém byla rozpuštěna nagaráza. Celý objem byl následně centrifugován 5 min při 5000 x g. Výsledný pelet byl rozsuspendován v pufru 1 a 10 min centrifugován při 800 x g. Získaný supernatant byl centrifugován 10 min při 9000 x g a tak vzniklý pelet (IMFM) byl opět rozsuspendován v pufru 1 a 10 min centrifugován 9000 x g. Centrifugace byla opakována po rozsuspendování peletu v pufru 2. Konečný pelet IMFM byl rozsuspendován ve 190 µl pufru 2 a rozdělen na

dvě poloviny, přičemž do jedné z těchto polovin bylo doplněno 95 μ l pufru 2 (vzorky pro měření spotřeby kyslíku a enzymových aktivit) a do druhé poloviny 95 μ l pufru 3 (vzorky pro stanovení exprese proteinů).

Část získaných vzorků byla okamžitě použita pro měření spotřeby kyslíku a zbytek vzorků byl zamražen a uchováván při teplotě -80°C .

Obrázek 4.1 Schéma izolace subpopulací mitochondrií



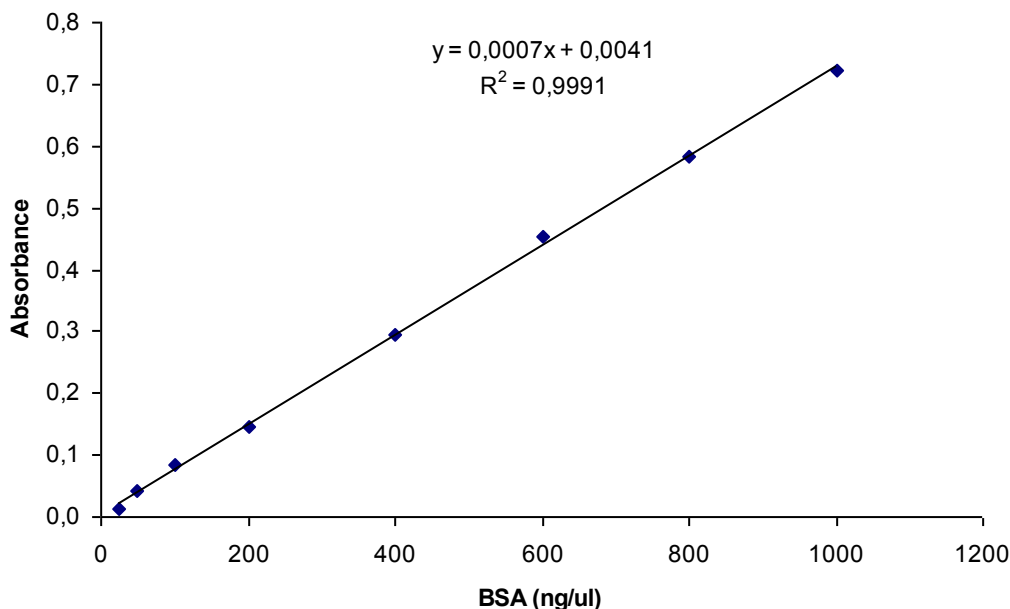
SSM – subsarkolemální mitochondrie, IMFM – intermyofibrilární mitochondrie. Poslední centrifugace každé ze subpopulací je prováděna v pufru bez BSA.

4.6. Stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové

Metoda je založena na vazbě modrého barviva Coomassie Brilliant Blue (součást činidla Bradfordové) na neznámý protein (Bradford, 1976). Množství navázaného činidla ve vzorcích je vztaženo na různá množství standardního proteinu (BSA; $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, Bio-Rad).

Kalibrační křivka byla připravena v koncentracích 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800 a 1000 ng BSA/ μl . Blank (redestilovaná H_2O), standardy a vzorky byly napipetovány vždy v tripletu po 10 μl na 96-jamkovou destičku NUNC plate (Thermo Fisher Scientific). K blanku, standardu i vzorkům bylo přidáno 250 μl činidla Bradfordové a ponecháno 10 min inkubovat. Absorbance byla změřena na fluorometru (Varioscan Flash, micro plate reader, Thermo Scientific, software Skanlt pro Varioskan Flash) při vlnové délce 595 nm. Ze získané kalibrační křivky (viz graf 4.1) byly posléze odečteny koncentrace proteinů ve vzorcích.

Graf 4.1 Kalibrační křivka pro odečtení koncentrace proteinů ve vzorcích podle metody Bradfordové



Každý bod kalibrační přímky je průměrem ze tří stanovení. BSA – hovězí sérový albumin, R^2 – hodnota spolehlivosti, y – rovnice regrese.

4.7. Měření spotřeby kyslíku mitochondrií

K měření spotřeby kyslíku izolovaných mitochondrií byl používán respirometr s vysokým rozlišením (OROBOROS Oxygraph-2k, Oroboros instruments). Tento přístroj je složen ze dvou uzavřených skleněných komůrek o objemu 2 cm³ vybavených polarografickým kyslíkovým senzorem, který je tvořen Pt katodou a Ag/AgCl anodou, jež jsou ponořené v KCl elektrolytu (Oroboros instruments). Senzor je funkčně totožný s tzv. Clarkovou kyslíkovou elektrodou. V každé komůrce je míchadlo, které míchá médium se vzorkem rychlostí 750 rpm, a je udržována konstantní teplota (30 °C). Respirometr zaznamenává proud, který prochází senzorem a jehož hodnota je přímo úměrná koncentraci kyslíku na katodě. Naměřená data jsou ukládána každé 2 s (software DatLab4, Oroboros instruments). Spotřeba kyslíku je vyjádřena v pmolO₂.s⁻¹.mg proteinu⁻¹.

Stav daných mitochondrií a funkčnost jednotlivých komplexů dýchacího řetězce lze ověřit po přidání substrátů, inhibitorů (viz tabulka 4.2) a rozpřahovačů. Rozpřažení mitochondrií, kdy je zkratován protonový gradient na vnitřní mitochondriální membráně, můžeme dosáhnout například pomocí detergentů nebo látek, které působí jako protonofory (např. FCCP, CCCP, 2,4-dinitrofenol).

Kvalitu izolovaných mitochondrií lze charakterizovat např. indexem respirační kontroly, který vyjadřuje míru stimulace dýchání po přidání ADP a který se počítá jako poměr dýchání ve stavu III a stavu IV.

Tabulka 4.2 Přehled substrátů a inhibitorů jednotlivých komplexů dýchacího řetězce

Komplex	Substráty	Inhibitory
I	glutamát, malát	rotenon
II	sukcinát	-
III	-	antimycin A, myxothiazol
IV	TMPD+askorbát	KCN, NaCN
V	ADP	oligomycin, aurovertin

Respirace izolovaných mitochondrií byla měřena v inkubačním médiu (80 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 4 mM KH_2PO_4 , 3 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, pH 7,2).

Do komůrky s pufrem byl nejdříve nepipetován vzorek mitochondrií (150 μg proteinu). Spotřeba kyslíku SSM a IMFM byla měřena nejdříve bez přidání substrátu tzv. endogenní respirace, dále po přidání 20 μl 1 M směsi glutamátu a malátu, 10 μl 0,1 M ADP, následně 2 μl 1 mM oligomycinu (inhibitor ATPsyntázy) a 1 μl 1 mM FCCP (rozpráhovač oxidativní fosforylace).

4.8. Měření enzymových aktivit

4.8.1. Aktivita citrátsyntázy

Aktivita citrátsyntázy (CS) byla stanovena nepřímo. CS katalyzuje reakci přenosu acylové skupiny z acetyl-CoA na oxalacetát za vzniku citrátu. S thioskupinou vzniklého koenzymu A reaguje tzv. Ellmanovo činidlo (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina; DTNB), přičemž lineární nárůst absorbance vznikajícího produktu je zaznamenáván při vlnové délce 412 nm (spektrofotometr Shimadzu UV-1650, software UVProbe 2.21). Konstantní teplota reakce (37 °C) je udržována pomocí vodní lázně s termoregulátorem (mLw). Aktivita CS je vyjádřena v $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteinu}^{-1}$ dle Lambert-Beerova zákona (molární absorpční koeficient $\epsilon_{412} = 13,6 \times 10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$).

Aktivita CS byla měřena v 1ml kyvetě, do níž byly postupně napipetovány všechny složky reakce tak, aby výsledný objem směsi byl 1 ml. Nejdříve byl do kyvety napipetován 10 mM Tris-HCl (pH 8,1), dále příslušné množství vzorku (10 μg proteinu) a 10 μl 10% detergentu Tritonu X-100. Směs byla důkladně promíchána a dále k ní bylo přidáno 10 μl 12 mM acetyl-CoA a 10 μl 10 mM DTNB (DTNB rozpuštěno v 1 M Tris-HCl, pH 8,1). Tím byla spuštěna nespecifická reakce thioskupin obsažených ve vzorku. Přibližně po 1 min byla reakce spuštěna přidáním 50 μl 10 mM oxalacetátu (substrát reakce, rozpuštěn v 1M Tris-HCl, pH 8,1) a byla sledována specifická aktivita CS, od které byla následně odečtena aktivita pozadí.

4.8.2. Aktivita sukcinátdehydrogenázy

Sukcinátdehydrogenáza (SDH) katalyzuje oxidaci sukcinátu na fumarát. Reakce je sledována pomocí redukce artificiálního akceptoru elektronů – modré barvivo 2,6-dichlorfenolindolfenol (DCIP), protože klíčové komponenty reakce nemohou být měřeny přímo. Přirozený tok elektronů přes III. a IV. komplex je inhibován pomocí KCN, který blokuje přenos elektronů z cytochromu a_3 na kyslík. Redukce DCIP je měřena jako pokles absorbance při 600 nm (spektrofotometr Shimadzu UV-1650, software UVProbe 2.21). Konstantní teplota reakce (37 °C) je udržována pomocí vodní lázně s termoregulátorem (mLw). Aktivita SDH je vyjádřena v $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteinu}^{-1}$ dle Lambert-Beerova zákona (molární absorpční koeficient $\epsilon_{600} = 19,1 \times 10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$).

Aktivita SDH byla měřena v 1ml kyvetě, do níž byly postupně napipetovány všechny složky reakce tak, aby výsledný objem směsi byl 1 ml. Nejprve byl do kyvety napipetován pufr (50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 7,4), k němuž byly postupně přidány 10 μl 5 mM KCN, vzorek (100 μg proteinu) a 10 μl 10% Tritonu X-100. Směs byla důkladně zamíchána a cca 1 min inkubována. Poté bylo přidáno 15 μl 10 mM DCIP (pozorovaná absorbance by měla být cca 2,0). Reakce SDH byla spuštěna přidáním 50 μl 500 mM sukcinátu.

4.9. Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE)

Při SDS-PAGE dochází k separaci proteinů na základě jejich elektroforetické pohyblivosti, která závisí především na délce polypeptidového řetězce, molekulární hmotnosti, stupni denaturace a posttranslačních modifikacích proteinu. DTT přidané ke vzorkům redukuje disulfidické vazby a SDS učiní proteiny vzhledem k jejich molekulární hmotnosti záporně nabitými. Proteiny pak putují v elektrickém poli od katody k anodě.

4.9.1. Příprava gelů na elektroforézu

Polyakrylamidový gel vzniká polymerací akrylamidu a N,N-methylenbisakrylamidu (BIS). Reakce je zahájena volnými radikály, které vznikají při rozkladu persíranu amonného. Jako stabilizátor volných radikálů se do směsi přidává N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED). Lineární řetězce vznikají spojováním monomerů akrylamidu a příčné vazby mezi nimi jsou tvořeny BIS. Čím je koncentrace akrylamidu vyšší, tím jsou póry gelu menší. Koncentrace polyakrylamidu v dělicím gelu byla 10 % nebo 15 % (viz tabulka 4.3) a ve startovacím gelu byla 4 % (viz tabulka 4.4).

Polyakrylamidový dělicí gel (příprava viz tabulka 4.3) byl nanesen mezi vertikálně umístěná skla elektroforetické soustavy Mini – PROTEAN 3 Cell firmy Bio – Rad[®] metodou podle Ogity a Markerta (Ogita a Markert, 1979) 1 cm pod okraj skel (rozměry gelů: 65 x 85 x 0,75 mm). Pomocí injekční stříkačky s jehlou roztok byl separační gel opatrně převrstven redestilovanou vodou a ponechán zpolymerovat (40 min). Po ztuhnutí separačního gelu byla opatrně odsáta redestilovaná voda pomocí filtračního papíru. Dále byl do zbývajících prostorů mezi skly nanesen 4% zaostřovací gel (příprava viz tabulka 4.4), následně byl do něj zasunut hřebínek pro vytvoření jamek na nanášení vzorků a ponechán zpolymerovat (20 min). Po ztuhnutí byl hřebínek vyjmut a vzniklé jamky byly důkladně promyty redestilovanou vodou. Poté byla skla podle instrukcí výrobce přenesena do elektroforetické soustavy a ponořena do elektroforetické vany s vychlazeným elektrodoým pufrem (0,1 M Tris, 0,5% (w/v) SDS, 0,96 M glycin, pH 8,3), který byl navíc nalit i mezi skla.

Tabulka 4.3 Příprava 10% a 15% dělicích gelů na elektroforézu (množství chemikálií odpovídá přípravě dvou gelů, chemikálie je třeba přidávat podle pořadí v tabulce a důkladně míchat)

Chemikálie	10% gel	15% gel
30% (w/v) Akrylamid/bisAkrylamid	3,32 ml	7,50 ml
Roztok 1,5 M Tris-HCl, 0,4% (w/v) SDS, pH 8,8	2,42 ml	3,75 ml
red. H ₂ O	4,15 ml	3,75 ml
TEMED	7 μ l	10 μ l
10% (w/v) persíran amonný	70 μ l	50 μ l

Tabulka 4.4 Příprava 4% zaostřovacího gelu na elektroforézu (množství chemikálií odpovídá přípravě dvou gelů, chemikálie je třeba přidávat podle pořadí v tabulce a důkladně míchat)

Chemikálie	4% gel
30% (w/v) Akrylamid/bisAkrylamid	0,65 ml
Roztok 0,5 M Tris-HCl, 0,4% (w/v) SDS, pH 6,8	1,25 ml
red. H ₂ O	3,05 ml
TEMED	5 μ l
10% (w/v) persíran amonný	50 μ l

4.9.2. Příprava vzorků mitochondrií na SDS elektroforézu

Rozmražené vzorky mitochondrií s přidanými inhibitory proteáz byly krátce zcentrifugovány 30 s při 7000 x g. Podle stanovené koncentrace proteinů byly vzorky zředěny vzorkovým pufrům (0,3 M Tris, 10% (v/v) glycerol, 0,2% (w/v) BPB, 0,13 M DTT, pH 6,8), který zvyšuje hustotu vzorku a usnadňuje jeho nanášení na gel. Naředěné vzorky byly vařeny 3 min v bločku při 100 °C. Po povaření byly vzorky opět stočeny na centrifuze po dobu 30 s při 7000 x g.

Do jamek zaostřovacího gelu byl nanesen standard molekulových hmotností (5 μ l) a vzorky subpopulací mitochondrií (2-3 μ g proteinu pro MnSOD; 2-25 μ g proteinu pro Cx43; 20 μ g proteinu pro Na⁺/K⁺-ATPázu α ; 3-15 μ g proteinu pro ALDH2).

K elektroforetické soustavě byl připojen stabilizovaný zdroj stejnosměrného napětí, na kterém byly nastaveny následující parametry:

- *proud*:
 - 15 mA/gel před zapuštěním vzorků do dělicího gelu – cca prvních 10 min
 - 30 mA/gel po zapuštění vzorků do separačního gelu
- *napětí*: 400 V
- *čas*: cca 40 min (MnSOD), 1 hod (Cx43), 2 hod (Na⁺/K⁺-ATPázy), 1,5 hod (ALDH2)

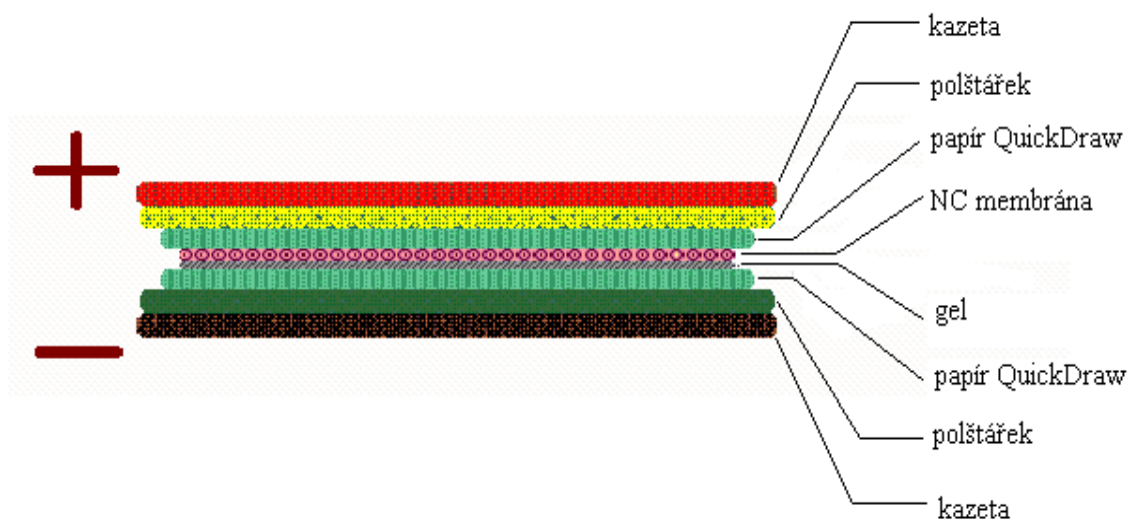
Po ukončení elektroforézy byl vypnut zdroj napětí. Gely byly vyjmuty z elektroforetické vany, odděleny od krycích skel a přeneseny do přenosového pufru (0,025 M Tris, 0,192 M glycín, 20% (v/v) methanol, pH 8,3) v plastové misce Sterilin[®], kde se ekvilibrovaly minimálně 5 min.

4.10. Western blotting

Po rozdělení vzorků na SDS elektroforéze jsou záporně nabitě proteiny (obalené SDS) přeneseny působením elektrického proudu z gelu na povrch nitrocelulózové (NC) membrány.

Elektropřenos proteinů z gelů na NC membrány byl prováděn metodou podle Towbina *et al.* (Towbin *et al.*, 1979) v elektropřenosové soupravě (AmershamTM, 1997) pro ECL. Z NC membrány HybondTM ECLTM a z papíru QuickDraw^(tm) byly nastříhány obdélníčky o rozměrech 65 x 85 mm. NC membrány byly ekvilibrovány cca 2 min v přenosovém pufru. Následně byl sestaven sendvič pro elektropřenos (viz obrázek 4.2) tak, aby byly všechny jeho části stále ponořeny v přenosovém pufru a před přiložením jím navlhčeny. Důležitý je dobrý kontakt mezi vrstvami (zvláště mezi gelem a NC membránou), proto byly vzduchové bublinky mezi vrstvami vytlačeny opatrným válením zkumavky. Vrstvy byly přikládány do kazety na Western blotting v tomto pořadí: speciální polštářek, papír QuickDraw^(tm), gel, NC membrána, papír QuickDraw^(tm) a speciální polštářek.

Obrázek 4.2 Sendvič pro elektropřenos proteinů na NC membrány



Kazeta byla přiklopena a zajištěna tak, aby byl dokonalý kontakt pro elektropřenos mezi jednotlivými vrstvami v sendviči a aby byl po celé ploše gelu konstantní tlak. Sestavené sendviče byly zasunuty do vany pro elektropřenos naplněné vychlazeným přenosovým pufrem tak, aby záporně nabitě proteiny putovaly v elektrickém poli k anodě a vázaly se na NC membránu. Vana pro elektropřenos byla zapojena ke stabilizovanému zdroji stejnosměrného napětí a byly nastaveny tyto parametry:

- *proud*: 350 mA
- *napětí*: 100 V
- *čas*: 1 hod

Po ukončení elektropřenosu byla NC membrána pro kontrolu kvantitativního přenosu proteinů ponořena na několik sekund do barvicího roztoku Ponceau 2S (0,1% (w/v) červeně Ponceau 2S v 1% (v/v) kyselině octové), posléze opláchnuta redestilovanou vodou a ponořena do roztoku TTBS (0,1 M Tris, 2,5 M NaCl, pH 7,5 – 0,5% (v/v) Tween 20).

4.11. Imunodetekce

Proteiny přenesené při Western blottingu na NC membránu byly detekovány protilátkami. Na komplex proteinu a primární protilátky se následně naváže sekundární protilátka konjugovaná s reportérovým enzymem křenovou peroxidázou (HRP).

Imunodetekce MnSOD, ALDH2, Cx43 a Na⁺/K⁺-ATPázy α na NC membránách byla prováděna podle doporučených standardních postupů – podle návodu pro ECL (AmershamTM, 1997) a podle návodu firmy Bio-Rad[®] pro Immun-Blot[®] (Bio-Rad, 1996). Veškeré inkubace a promývání membrán bylo prováděno za míchání na laboratorní kývačce ve čtvercových plastových miskách Sterilin[®] o rozměru 100 x 100 mm.

Nejdříve byla na membráně zablokována nespecifická vazebná místa 5% roztokem nízkotučného sušeného mléka v pufru TTBS po dobu 1 hod. Před přidáním primární protilátky byly membrány důkladně třikrát po 5 min promyty v roztoku TTBS (cca 20 ml). Následně bylo naředěno odpovídající množství primární protilátky roztokem TTBS (10 ml TTBS na membránu; ředění viz tabulka 4.5). Poté byly membrány inkubovány v primární protilátce po dobu 1,5 hod (MnSOD, ALDH2, Cx43) nebo přes noc (Na⁺/K⁺-ATPáza α) a následně opět důkladně promyty třikrát po 5 min v roztoku TTBS. Posléze byly membrány inkubovány po dobu 1 hod v odpovídajícím množství sekundární protilátky naředěné roztokem TTBS (20 ml TTBS na membránu; ředění viz tabulka 4.6) a následně opět důkladně promyty třikrát po 5 min v roztoku TTBS.

Tabulka 4.5 Použité primární protilátky a jejich ředění

Protilátka	Charakteristika	Ředění
MnSOD (Cayman chemical)	Králičí polyklonální protilátka	1:2500
ALDH2 (Santa Cruz biotechnology)	Kozí polyklonální protilátka	1:1000
Cx43 (Sigma-Aldrich)	Králičí polyklonální protilátka	1:8000
Na ⁺ /K ⁺ -ATPáza α (Santa Cruz biotechnology)	Králičí polyklonální protilátka	1:5000

Tabulka 4.6 Použité sekundární protilátky a jejich ředění

Výrobce	Charakteristika	Ředění
Sigma-Aldrich	Kozí antiséra proti králičí protilátce	1:6000
Sigma-Aldrich	Králičí antiséra proti kozí protilátce	1:80000

4.12. Metoda zesílené chemiluminiscence (ECL)

ECL (enhanced chemiluminiscence) je metoda detekce peroxidase aktivity prostřednictvím chemiluminiscence za přítomnosti zesilovačů. Luminiscence je popsána jako emise světla vznikající přeměnou energie molekuly chemické látky v excitovaném stavu. Metoda ECL používá jako substrát cyklický diacylhydrazid luminolu, který je v mírně alkalickém prostředí oxidován peroxidem vodíku za katalýzy HRP. Produkt oxidace je v excitovaném stavu, ze kterého přechází emisí světla do základního stavu. K zesílení chemiluminiscence dochází za přítomnosti látek na bázi fenolů. Díky tomu se světelný tok zvýší asi 1000krát a prodlouží dobu emise ve srovnání s reakcí bez zesilovačů. Luminiscence v tomto systému dosahuje maxima po 5 až 20 min a poté pomalu klesá s poločasem cca 60 min. Maximum emise má vlnovou délku 428 nm, a je tedy zachytitelné na film citlivý k modrému světlu (autoradiografický nebo rentgenový film).

Pro ECL byly připraveny vyvolávací roztoky:

1. 50 ml 2,5 mM roztoku luminolu v 0,1 M Tris; pH 8,8 + 220 μ l 90 mM roztoku p-kumarové kyseliny v DMSO
2. 5,4 mM H_2O_2 v 0,1 M Tris; pH 8,8

ECL bylo prováděno v temné komoře a bylo postupováno podle instrukcí výrobce (AmershamTM, 1997). Do zkumavky byl připraven čerstvý roztok smícháním vyvolávacích roztoků v poměru 1:1 a obsah zkumavky byl důkladně promíchán. Po imunodetekci byly membrány okapány a přeneseny na víčko misky Sterilin[®] tak, aby strana s proteiny směřovala

nahoru. Detekční roztok byl nalit rovnoměrně na membrány (1,5 ml/membrána) a ponechán 1 min působit. Poté byla membrána důkladně okapána a přenesena na fólii (např. potravinová) tak, aby mezi lícovou stranou membrány a fólií nebyly bubliny a záhyby. Následně byla membrána vložena do autoradiografické kazety a ve tmě na ni byl přiložen autoradiografický film (Medical X-Ray Film, Foma). Kazeta byla zatížena a film byl ponechán po danou dobu exponovat (pro všechny sledované proteiny byla vyzkoušena optimální doba expozice). Exponovaný film byl nakonec vložen do přístroje Fomei Optima X-Ray Film Procesor[®] od firmy Protec Medizintechnik GmbH & Co, který film vyvolal.

4.13. Vyhodnocování signálu na filmech

Vyvolané filmy byly naskenovány na stolním skeneru Epson Perfection 1240 U[®]. Pro skenování byly nastaveny tyto podmínky:

- *jas:* 138
- *kontrast:* 146
- *typ obrazu:* Black & White Photo
- *nastavení:* adaptér pro pozitivní film
- *rozlišení:* 300 dpi
- *rozměry:* 100 %
- *formát:* 8bit TIFF uncompressed (přípona .tif)

Vyhodnocení denzitometrického objemu skvrn na filmu bylo následně prováděno pomocí programu ImageQuant. Výsledkem byla bezrozměrná hodnota – denzitometrický objem skvrny, která se získá sečtením hodnot všech pixelů zahrnutých do skvrny, zmenšená o hodnotu pozadí. Jako hodnota pozadí pro danou skvrnu je brán průměr hodnot pixelů ležících pod plochou ohraničující skvrnu.

Data byla zpracována v programu Microsoft Excel, pomocí automatizovaného souboru vzorců. Denzitometrický objem skvrny byl přepočítán na 1 µg aplikovaného proteinu vzorku. Grafy a tabulky v kapitole 5 jsou uvedeny v arbitrárních jednotkách, které jsou dány součtem hodnocených denzitometrických objemů, který je roven 100.

4.14. Statistické vyhodnocování

Data byla statisticky zpracována v programu Jandel Scientific – SigmaStat a Microsoft Excel. Výsledky byly vyjádřeny jako aritmetický průměr, rozptyl dat jako střední chyba průměru (S.E.M.). Statistická významnost rozdílů mezi skupinami byla hodnocena pomocí jednocestné analýzy (ONE WAY ANOVA) nebo hodnocení rozdílů mezi více skupinami pomocí dvoucestné analýzy variance (TWO WAY ANOVA) a následného Student – Newman – Keulsova testu. Za statisticky významný byl považován rozdíl s hladinou významnosti menší než 0,05 ($p < 0,05$).

5. Výsledky

5.1. Zavedení metody izolace subpopulací mitochondrií

Tato výsledková část diplomové práce je věnována zavedení modifikovaného postupu izolace mitochondriálních subpopulací podle Kavazise *et al.* (Kavazis *et al.*, 2009; viz kapitola 4.5). Při izolaci mitochondrií jsem opakovaně získala přibližně stejný výtěžek a stejné aktivity CS a SDH a získané frakce mitochondrií nebyly kontaminovány plazmatickou membránou. Takto izolované subpopulace mitochondrií byly v dobrém stavu (viz spotřeba kyslíku). Abych ověřila, že se opravdu jedná o žádané subpopulace, zjišťovala jsem ve frakcích mitochondrií přítomnost Cx43, který má být přítomen pouze u SSM (Boengler *et al.*, 2009).

5.1.1. Výtěžky izolace subpopulací mitochondrií

Tabulka 5.1 a graf 5.1 znázorňují výtěžky SSM a IMFM izolovaných z levé komory (LV) a septa normoxických potkanů. Výtěžek IMFM je signifikantně o 170 % vyšší než výtěžek SSM.

Tabulka 5.1 Výtěžky frakcí SSM a IMFM

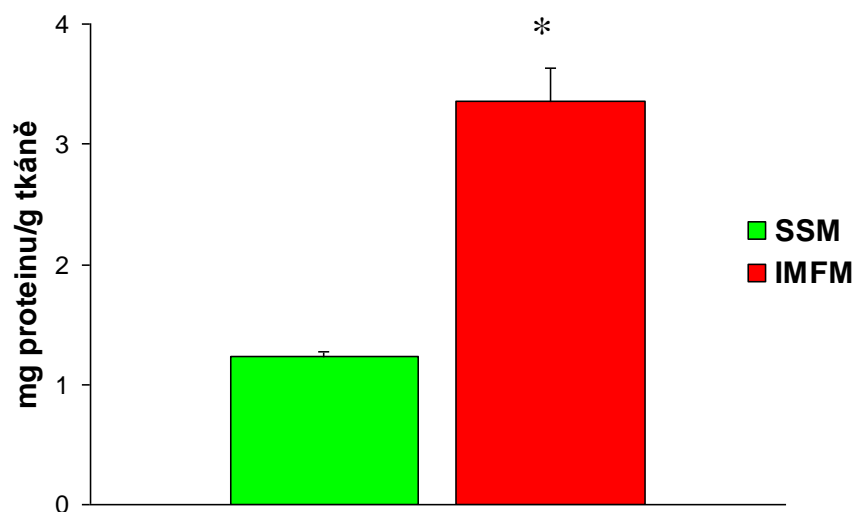
Mitochondriální protein (mg/g tkáně)	
Frakce mitochondrií	Nor
SSM	1,24 ± 0,04
IMFM	3,36 ± 0,27 *

Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr ± S.E.M. n=3

SSM – subsarkolemální mitochondrie, IMFM – intermyofibrilární mitochondrie, Nor – normoxie.

* - statisticky významný rozdíl SSM vs. IMFM ($p < 0,05$)

Graf 5.1 Výtěžky frakcí SSM a IMFM



Chybové úsečky vyjadřují S.E.M. n=3

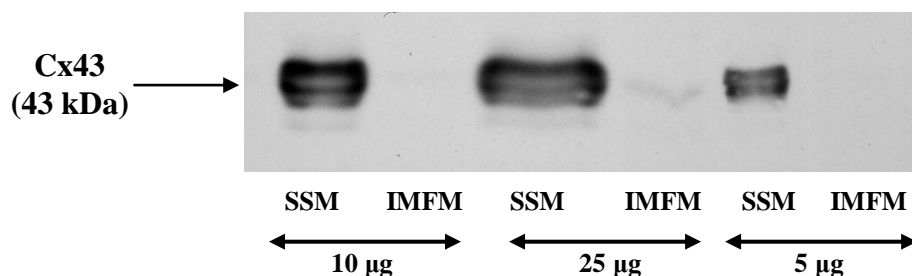
SSM – subsarkolemální mitochondrie, IMFM – intermyofibrilární mitochondrie

** - statisticky významný rozdíl SSM vs. IMFM ($p < 0,05$)*

5.1.2. Charakterizace subpopulací mitochondrií pomocí konexinu 43

Pro charakterizaci jednotlivých subpopulací mitochondrií byl použit Cx43, který jsme pozorovali pouze u SSM (obrázek 5.1), stejně tak jako Boengler *et al.* (Boengler et al., 2009). U nejvyšší nanášky 25 μg proteinu je vidět u IMFM nepatrná kontaminace Cx43. Vzhledem k tomu, že je Cx 43 převážně proteinem plazmatické membrány, bylo nezbytné ověřit, zda jí nejsou vzorky kontaminovány a detekovaný Cx43 nepochází z ní (viz kapitola 5.1.3).

Obrázek 5.1 Přítomnost Cx43 v SSM a IMFM



Western blot.

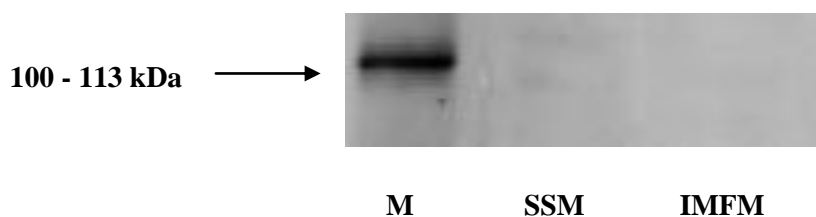
SSM – subsarkolemální mitochondrie, IMFM – intermyofibrilární mitochondrie, Cx43 – konexin 43.

Nanášky: 10, 25 a 5 μg proteinu.

5.1.3. Stanovení Na^+/K^+ -ATPázy v mitochondriálních frakcích (kontaminace plazmatickou membránou)

Abych ověřila, že nejsou vzorky mitochondrií kontaminovány plazmatickou membránou, analyzovala jsem její přítomnost ve vzorcích mitochondrií pomocí Na^+/K^+ -ATPázy, konkrétně její α podjednotky, která není na jiné buněčné membráně přítomna. Na obrázcích 5.2 a 5.3 je vidět, že vzorky nejsou plazmatickou membránou kontaminovány, tedy detekovaný Cx43 v SSM (viz kapitola 5.1.2) pochází z mitochondrií. Jako pozitivní kontrola Na^+/K^+ -ATPázy α jsou zde použity na Na^+/K^+ -ATPázu bohatý homogenát mozku (viz obrázek 5.2) a mikrozomální frakce získaná v průběhu izolace mitochondrií (viz obrázek 5.3).

Obrázek 5.2 Přítomnost Na^+/K^+ -ATPázy v mitochondriálních frakcích a mozku

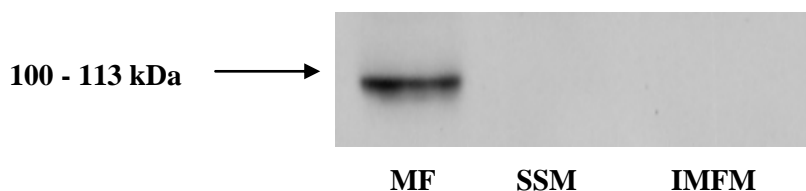


Western blot.

M – homogenát mozku, SSM – subsarkolemální mitochondrie, IMFM – intermyofibrilární mitochondrie.

Nanášky: SSM a IMFM - 20 μg proteinu, M – 3,5 μg proteinu.

Obrázek 5.3 Přítomnost Na^+/K^+ -ATPázy v mitochondriálních frakcích a mikrozomální frakci



Western blot.

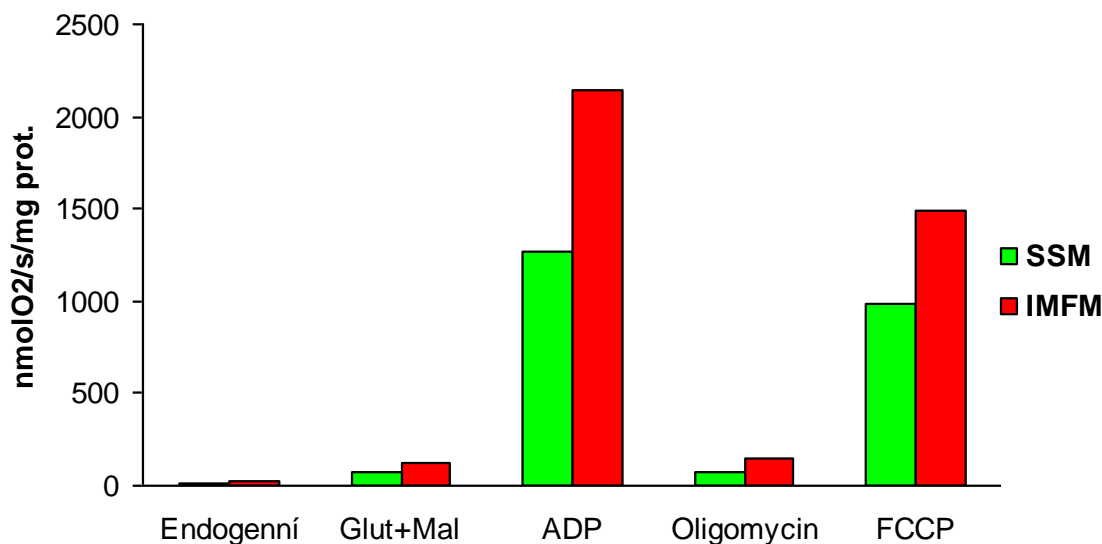
MF – mikrosomální frakce, SSM – subsarkolemální mitochondrie, IMFM – intermyofibrilární mitochondrie.

Nanášky: MF, SSM a IMFM - 20 μg proteinu.

5.1.4. Spotřeba kyslíku mitochondriálních frakcí

Spotřeba kyslíku SSM a IMFM byla měřena nejdříve bez přidání substrátu, dále po přidání glutamátu a malátu (substráty I. komplexu dýchacího řetězce), ADP (substrát ATPsyntázy), oligomycinu (inhibitor ATPsyntázy) a FCCP (rozpřahovač oxidativní fosforylace). Graf 5.2 ukazuje, že IMFM mají po přidání všech substrátů 1,5 – 1,8 x větší spotřebu kyslíku než SSM. Index respirační kontroly je u SSM 16,2 a u IMFM 16,8.

Graf 5.2 Spotřeba kyslíku SSM a IMFM po přidání různých substrátů



Výsledky z jednoho frakcionačního pokusu. SSM – subsarkolemální mitochondrie, IMFM – intermyofibrilární mitochondrie; Endogenní – hodnoty spotřeby kyslíku mitochondrií bez přidaného substrátu, Glut+Mal – substráty I. komplexu dýchacího řetězce Glutamát+Malát, ADP – substrát ATPsyntázy, Oligomycin – inhibitor ATPsyntázy, FCCP – rozpřahovač oxidativní fosforylace..

5.1.5. Aktivita citrátsyntázy v mitochondriálních frakcích

V tabulce 5.2 a grafu 5.3 je znázorněna aktivita CS naměřená v SSM a IMFM z normoxického myokardu potkana. Byl zaznamenán náznak vyšší aktivity (o 19 %) u IMFM oproti SSM.

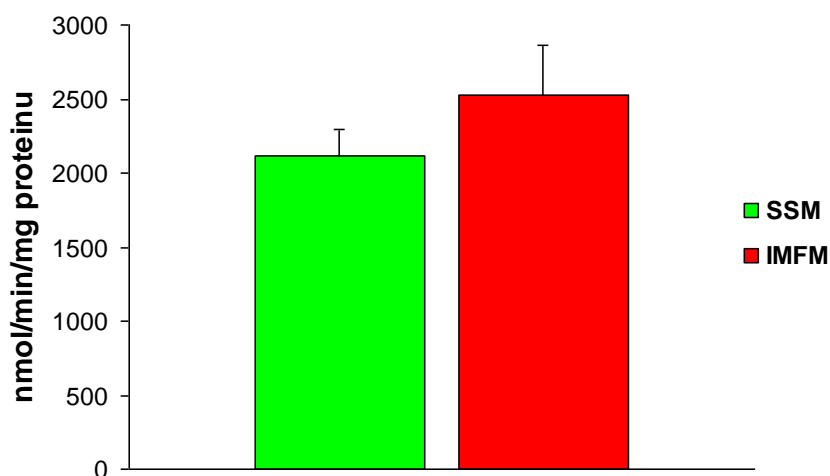
Tabulka 5.2 Aktivita citrátsyntázy v SSM a IMFM

Aktivita CS (nmol/min/mg proteinu)	
Frakce mitochondrií	Nor
SSM	2120 ± 178
IMFM	2526 ± 332

Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr ± S.E.M. n=6

SSM – subsarkolemální mitochondrie, IMFM – intermyofibrilární mitochondrie, CS – citrátsyntáza.

Graf 5.3 Aktivita citrátsyntázy v SSM a IMFM



Chybové úsečky vyjadřují S.E.M. n=6

SSM – subsarkolemální mitochondrie, IMFM – intermyofibrilární mitochondrie.

5.1.6. Aktivita sukcinátdehydrogenázy v mitochondriálních frakcích

V tabulce 5.3 a grafu 5.4 je znázorněna aktivita SDH naměřená v SSM a IMFM z normoxického myokardu potkana. Nebyl pozorován žádný rozdíl v aktivitě SDH mezi IMFM a SSM frakcemi.

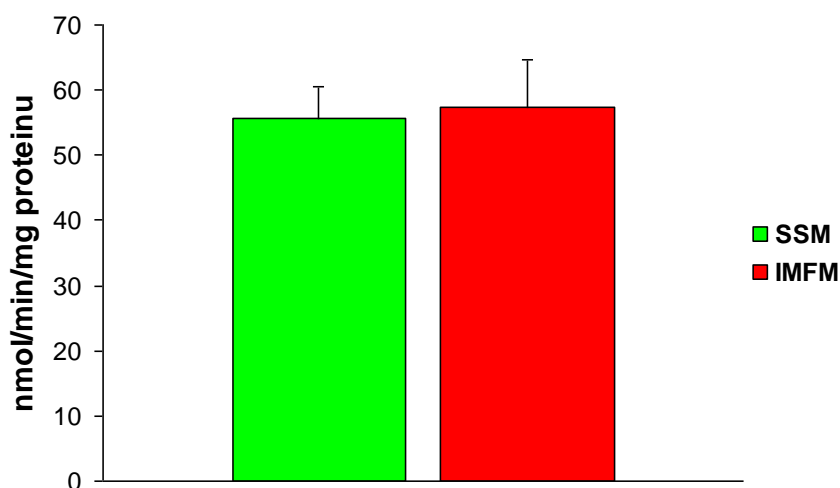
Tabulka 5.3 Aktivita sukcinátdehydrogenázy v SSM a IMFM

Aktivita SDH (nmol/min/mg proteinu)	
Frakce mitochondrií	Nor
SSM	56 ± 5
IMFM	57 ± 7

Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr ± S.E.M. n=6.

SSM – subsarkolemální mitochondrie, IMFM – intermyofibrilární mitochondrie, SDH – sukcinátdehydrogenáza.

Graf 5.4 Aktivita sukcinátdehydrogenázy v SSM a IMFM



Chybové úsečky vyjadřují S.E.M. n=6

SSM – subsarkolemální mitochondrie, IMFM – intermyofibrilární mitochondrie.

5.2. Adaptace na chronickou hypoxii

5.2.1. Vliv chronické hypoxie na hmotnostní parametry potkanů.

V tabulce 5.4 jsou ukázány hmotnostní parametry potkanů normoxických a potkanů adaptovaných na intermitentní chronickou hypoxii ve vysoké nadmořské výšce (IHA). Po adaptaci na IHA se signifikantně snížila hmotnost těla (BW) potkanů na 85 % hodnoty normoxických potkanů. Zvířata hypoxické skupiny měla o 13 % vyšší hmotnost srdce (HW) než normoxické kontroly. To bylo způsobeno především hypertrofií pravé komory (RV), která měla o 53 % vyšší hmotnost u adaptovaných než u normoxických zvířat, u LV a u septa nedošlo po hypoxii k signifikantnímu zvýšení hmotnosti. Relativní hmotnost srdce (HW/BW) adaptovaných zvířat byla ve srovnání s normoxickou skupinou o 33 % vyšší. Relativní hmotnost levé komory (LV/BW) se po adaptaci na hypoxii oproti normoxickým kontrolám zvýšila o 21 % a relativní hmotnost pravé komory (RV/BW) až o 80 %.

Tabulka 5.4 Hmotnostní parametry potkanů normoxických a potkanů po adaptaci na chronickou hypoxii

parametry	Nor	Hypo
n	18	18
BW (g)	425 ± 11	363 ± 7 #
HW (mg)	956 ± 32	1084 ± 34 #
LV (mg)	545 ± 20	561 ± 24
RV (mg)	195 ± 8	299 ± 9 #
S (mg)	216 ± 7	224 ± 9
HW/BW ($\cdot 10^{-3}$)	2,24 ± 0,03	2,99 ± 0,08 #
LV/BW ($\cdot 10^{-3}$)	1,28 ± 0,02	1,55 ± 0,06 #
RV/BW ($\cdot 10^{-3}$)	0,46 ± 0,01	0,83 ± 0,02 #
S/BW ($\cdot 10^{-3}$)	0,51 ± 0,01	0,62 ± 0,02 #
RV/LV	0,36 ± 0,01	0,54 ± 0,02 #

Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr ± S.E.M.

Nor – normoxie, Hypo - hypoxie, n – počet zvířat ve skupině, BW – hmotnost těla, HW – hmotnost srdce, LV – levá komora, RV – pravá komora, S – septum, HW/BW – relativní hmotnost srdce, LV/BW – relativní hmotnost levé komory, RV/BW – relativní hmotnost pravé komory, S/BW – relativní hmotnost septa.

- statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie ($p < 0,05$)

5.2.2. Výtěžky izolace SSM a IMFM z normoxické a na chronickou hypoxii adaptované levé komory myokardu potkana

Tabulka 5.5 a graf 5.5 ukazují výtěžky subpopulací mitochondrií izolovaných z LV myokardu potkanů normoxických a potkanů adaptovaných na chronickou hypoxii. Po chronické hypoxii jsme u obou mitochondriálních subpopulací získali nesignifikantně menší výtěžek mitochondrií (SSM o 24 %, IMFM o 5,2 %). Signifikantní rozdíl je pouze v případě, když porovnáváme SSM a IMFM. Výtěžek u IMFM je oproti SSM vyšší o 157 % u normoxie a o 223 % u hypoxie.

Tabulka 5.5 Výtěžky frakcí SSM a IMFM z normoxické a na chronickou hypoxii adaptované levé komory myokardu potkana

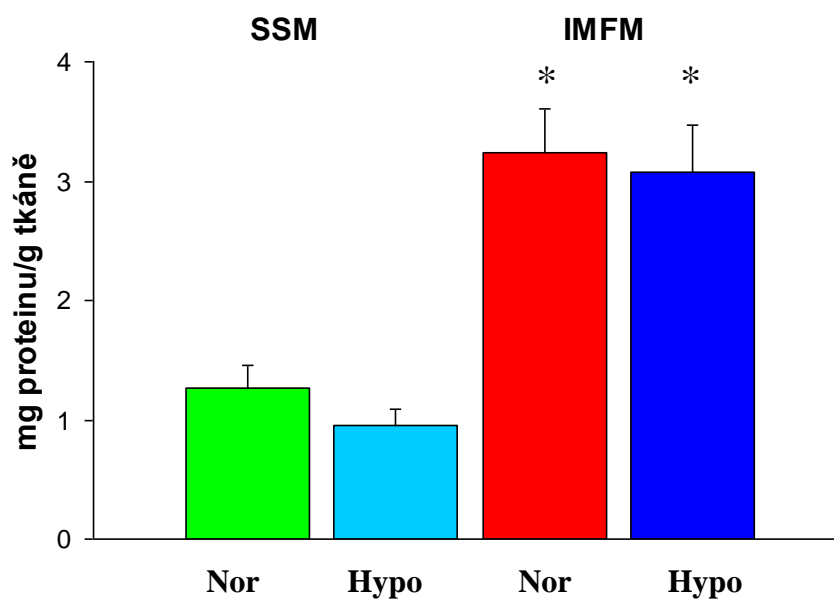
Mitochondriální proteiny (mg /g tkáně)		
Frakce mitochondrií	Nor	Hypo
SSM	1,26 ± 0,19	0,95 ± 0,13
IMFM	3,24 ± 0,36 *	3,07 ± 0,40 *

Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr ± S.E.M. n=6.

SSM – subsarkolemální mitochondrie, IMFM – intermyofibrilární mitochondrie, Nor – normoxie, Hypo – hypoxie.

** - statisticky významný rozdíl SSM vs. IMFM ($p < 0,05$)*

Graf 5.5 Výtěžky frakcí SSM a IMFM z normoxické a na chronickou hypoxii adaptované levé komory myokardu potkana



Chybové úsečky vyjadřují S.E.M. n=6

SSM – subsarkolemální mitochondrie, IMFM - intermyofibrilární mitochondrie, Nor - normoxie, Hypo – hypoxie.

** - statisticky významný rozdíl SSM vs. IMFM ($p < 0,05$)*

5.2.3. Aktivita citrátsyntázy v SSM a IMFM z normoxické a na chronickou hypoxii adaptované levé komory myokardu potkana

V tabulce 5.6 a grafu 5.6 je znázorněna aktivita CS naměřená v SSM a IMFM z normoxické a na chronickou hypoxii adaptované LV myokardu potkana. Nebyl pozorován žádný vliv hypoxie na aktivitu CS, ale byl zaznamenán náznak vyšších aktivit u IMFM oproti SSM, u normoxie o 19 % a u hypoxie o 25 %.

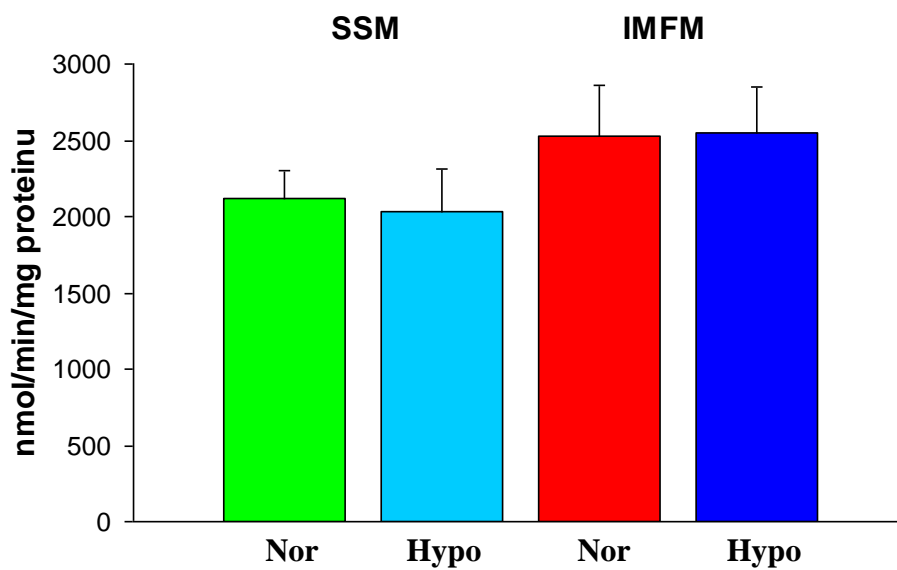
Tabulka 5.6 Aktivita citrátsyntázy v mitochondriálních subpopulacích: vliv chronické hypoxie

Aktivita CS (nmol/min/mg proteinu)		
Frakce mitochondrií	Nor	Hypo
SSM	2120 ± 178	2034 ± 281
IMFM	2526 ± 332	2548 ± 300

Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr ± S.E.M. n=6.

SSM – subsarkolemální mitochondrie, IMFM – intermyofibrilární mitochondrie, Nor – normoxie, Hypo – hypoxie, CS - citrátsyntáza.

Graf 5.6 Aktivita citrátsyntázy v mitochondriálních subpopulacích: vliv chronické hypoxie



Chybové úsečky vyjadřují S.E.M. n=6

SSM – subsarkolemální mitochondrie, IMFM – intermyofibrilární mitochondrie, Nor – normoxie, Hypo – hypoxie.

5.2.4. Aktivita sukcinátdehydrogenázy v SSM a IMFM z normoxické a na chronickou hypoxii adaptované levé komory myokardu potkana

V tabulce 5.7 a grafu 5.7 je znázorněna aktivita SDH naměřená v SSM a IMFM z normoxické a na chronickou hypoxii adaptované levé LV myokardu potkana. Nebyl pozorován žádný vliv hypoxie na aktivitu SDH, ale byl zaznamenán náznak vyšších aktivit u IMFM oproti SSM u potkanů adaptovaných na chronickou hypoxii (o 22 %).

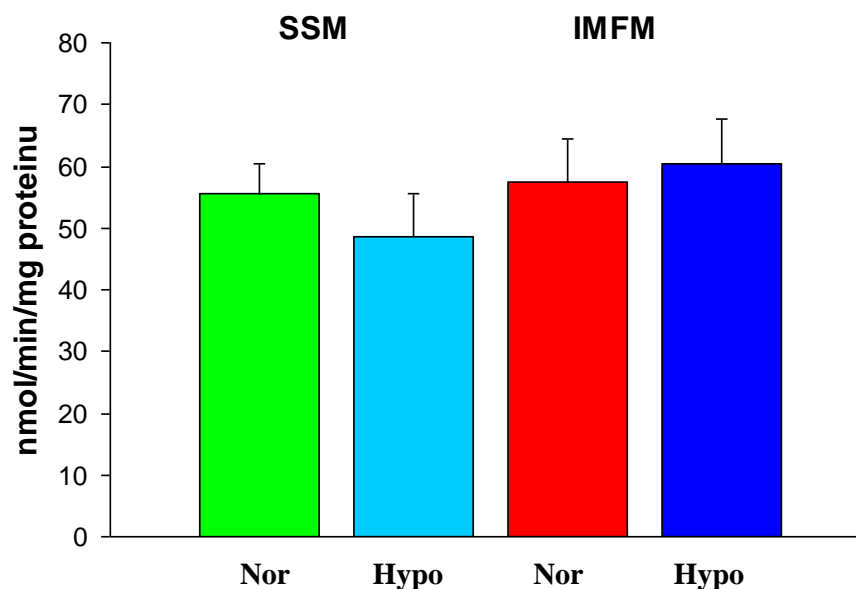
Tabulka 5.7 Aktivita sukcinátdehydrogenázy v mitochondriálních subpopulacích: vliv chronické hypoxie

Aktivita SDH (nmol/min/mg proteinu)		
Frakce mitochondrií	Nor	Hypo
SSM	56 ± 5	49 ± 7
IMFM	57 ± 7	60 ± 7

Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr ± S.E.M. n=6

SSM – subsarkolemální mitochondrie, IMFM – intermyofibrilární mitochondrie, Nor - normoxie, Hypo – hypoxie, SDH – sukcinátdehydrogenáza.

Graf 5.7 Aktivita sukcinátdehydrogenázy v mitochondriálních subpopulacích: vliv chronické hypoxie



Chybové úsečky vyjadřují S.E.M. $n=6$

SSM – subsarkolemální mitochondrie, IMFM – intermyofibrilární mitochondrie, Nor – normoxie, Hypo – hypoxie.

5.2.5. Exprese konexinu 43 v SSM a IMFM z normoxické a na chronickou hypoxii adaptované levé komory myokardu potkana

Tabulka 5.8 a graf 5.8 ukazují expresi Cx43 v SSM z normoxické a na chronickou hypoxii adaptované LV myokardu potkana. Nebyl zde pozorován žádný vliv hypoxie na expresi Cx43. Jak již bylo ukázáno, v IMFM se Cx43 nevyskytuje (viz kapitola 5.1.2).

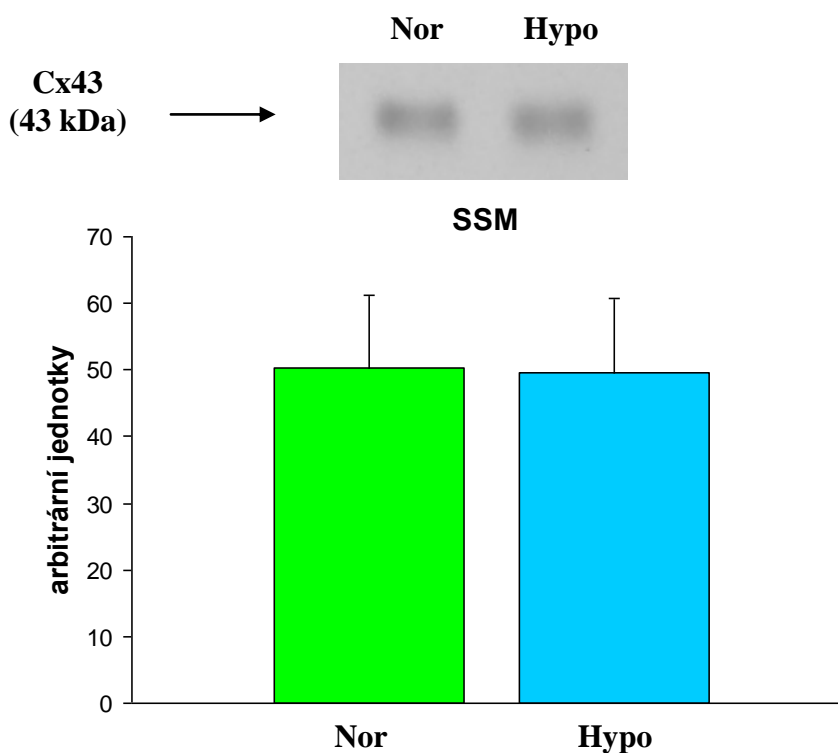
Tabulka 5.8 Exprese Cx43 v mitochondriálních subpopulacích: vliv chronické hypoxie

Cx43 (arbitrární jednotka)		
Frakce mitochondrií	Nor	Hypo
SSM	50,32 ± 10,95	49,68 ± 10,95

Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr ± S.E.M. n=6

SSM – subarkolemální mitochondrie, Nor – normoxie, Hypo – hypoxie, Cx43 – konexin 43.

Graf 5.8 Exprese Cx43 v mitochondriálních subpopulacích: vliv chronické hypoxie



Reprezentativní Western blot – nanášky : SSM - 2 µg proteinu, IMFM – 2 ug proteinu.

Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (vztaheno na 1 µg proteinu) všech experimentálních skupin je 100 %. Vzorky jsou hodnoceny z identického filmu.

Chybové úsečky vyjadřují S.E.M. n=6

SSM – subsarkolemální mitochondrie, IMFM – intramyofibrilární mitochondrie Nor – normoxie, Hypo – hypoxie, Cx43 – konexin 43.

5.2.6. Exprese MnSOD v SSM a IMFM z normoxické a na chronickou hypoxii adaptované levé komory myokardu potkana

Tabulka 5.9 a graf 5.9 ukazují expresi MnSOD v SSM a IMFM z normoxické a na chronickou hypoxii adaptované LV myokardu potkana. U normoxie byly pozorovány nižší hodnoty u IMFM oproti SSM (o 16,5 %), rozdíl hodnot ale není signifikantní. Po adaptaci na chronickou hypoxii byl pozorován náznak poklesu exprese MnSOD pouze u SSM (o 24,4 %). U IMFM nebyl žádný efekt hypoxie pozorován.

Tabulka 5.9 Exprese manganové superoxiddismutázy v mitochondriálních subpopulacích: vliv chronické hypoxie

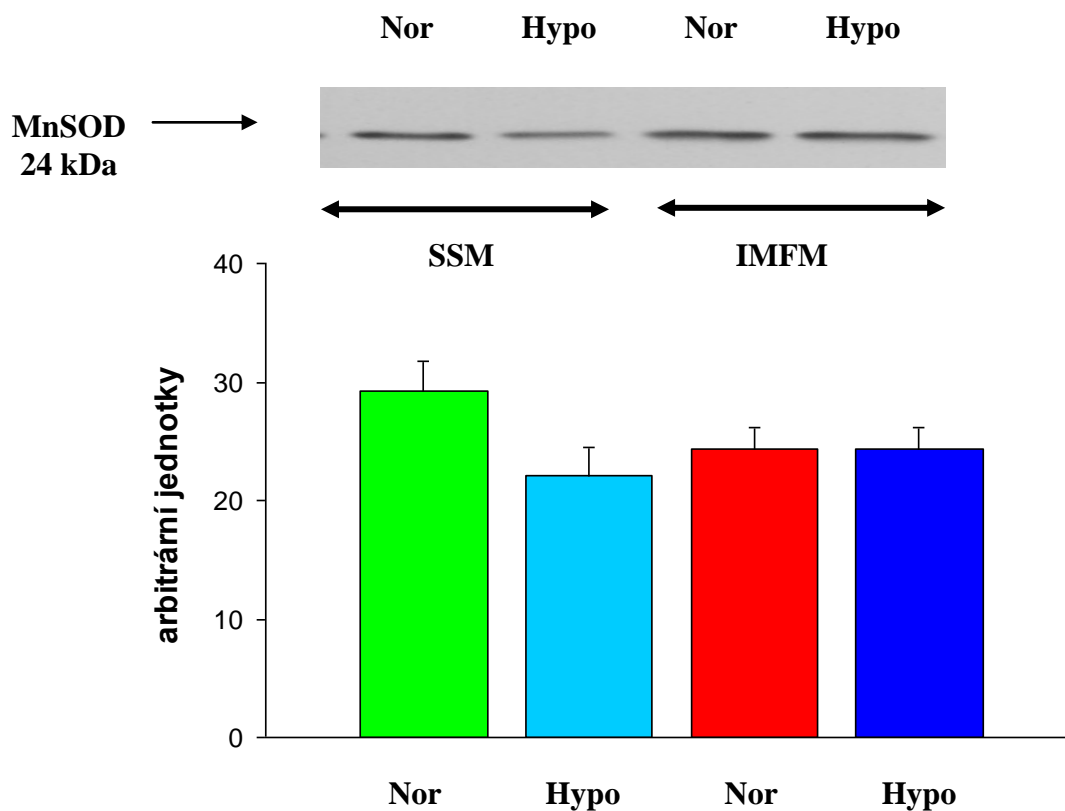
MnSOD (arbitrární jednotky)		
Frakce mitochondrií	Nor	Hypo
SSM	29,22 ± 2,55	22,09 ± 2,36
IMFM	24,39 ± 1,78	24,30 ± 1,85

Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr ± S.E.M. n=6

Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (vztaženo na 1 µg proteinu) všech experimentálních skupin je 100 %. Vzorky jsou hodnoceny z identického filmu.

SSM – subarkolemální mitochondrie, IMFM – intermyofibrilární mitochondrie, MnSOD – manganová superoxiddismutáza.

Graf 5.9 Exprese manganové superoxiddismutázy v mitochondriálních subpopulacích: vliv chronické hypoxie



Reprezentativní Western blot – nanášky : SSM - 2 μ g proteinu, IMFM – 3 μ g proteinu.

Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (vztaženo na 1 μ g proteinu) všech experimentálních skupin je 100 %. Vzorky jsou hodnoceny z identického filmu.

Chybové úsečky vyjadřují S.E.M. $n=6$

Nor – normoxie, Hypo – hypoxie, SSM – subsarkolemální mitochondrie, IMFM – intramyofibrilární mitochondrie, MnSOD – manganová superoxiddismutáza.

5.2.7. Exprese ALDH2 v SSM a IMFM z normoxické a na chronickou hypoxii adaptované levé komory myokardu potkana

Tabulka 5.10 a graf 5.10 ukazují expresi ALDH2 v SSM a IMFM z normoxické a na chronickou hypoxii adaptované LV myokardu potkana. Srovnání obou subpopulací mitochondrií z normoxické LV ukázalo, že exprese ALDH2 je u IMFM o 45 % vyšší než u SSM a tento rozdíl je signifikantní, u hypoxické LV to bylo o 84 %. Adaptace na chronickou hypoxii způsobila signifikantní pokles exprese ALDH2 u SSM o 50,6 % a u IMFM o 37 %.

Tabulka 5.10 Exprese aldehyddehydrogenázy 2 v mitochondriálních subpopulacích: vliv chronické hypoxie

ALDH2 (arbitrární jednotky)		
Frakce mitochondrií	Nor	Hypo
SSM	25,92 ± 2,07	12,81 ± 4,45 [#]
IMFM	37,68 ± 1,44 *	23,59 ± 3,67 ^{#*}

Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr ± S.E.M. n=5

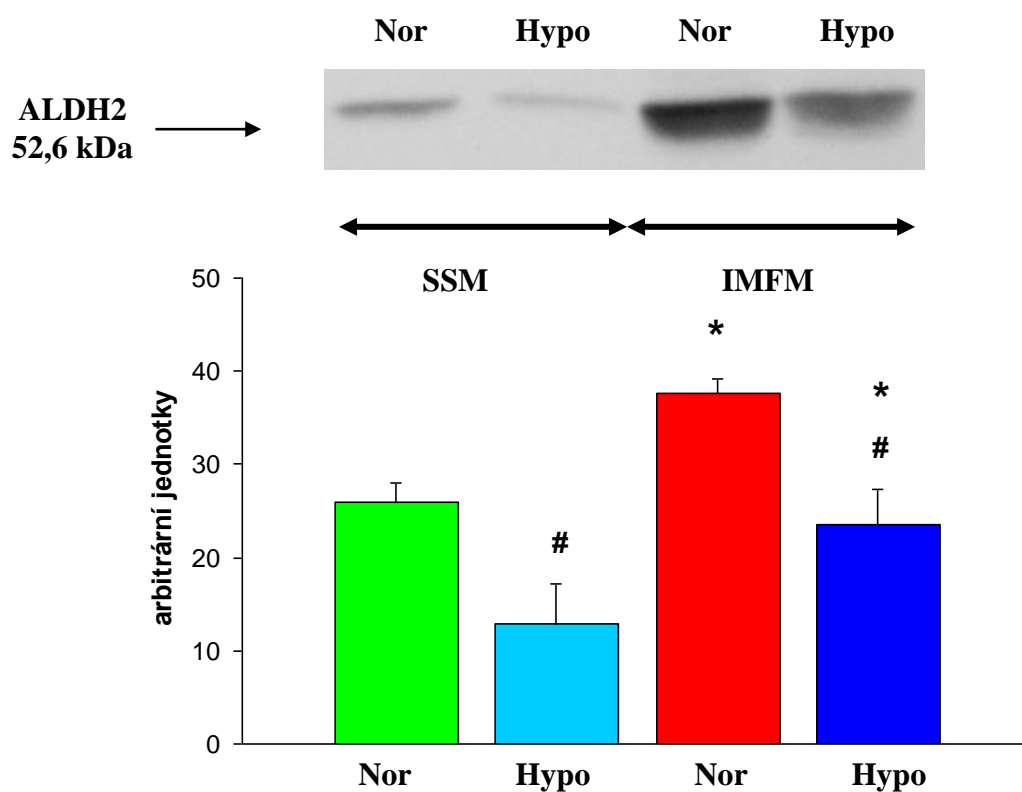
Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (vztaheno na 1 µg proteinu) všech experimentálních skupin je 100 %. Vzorčky jsou hodnoceny z identického filmu.

SSM – subarkolemální mitochondrie, IMFM – intermyofibrilární mitochondrie, ALDH2 – aldehyddehydrogenáza 2.

*- statisticky významný rozdíl SSM vs. IMFM ($p < 0,05$)

#- statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie ($p < 0,05$)

Graf 5.10 Exprese aldehyddehydrogenázy 2 v mitochondriálních subpopulacích: vliv chronické hypoxie



Reprezentativní Western blot – nanášky : SSM - 3 μ g proteinu, IMFM – 15 μ g proteinu.
Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (vztaheno na 1 μ g proteinu) všech experimentálních skupin je 100 %. Vzorok jsou hodnoceny z identického filmu.

Chybové úsečky vyjadřují S.E.M. $n=5$

SSM – subsarkolemální mitochondrie, IMFM – intermyofibrilární mitochondrie, Nor – normoxie, Hypo – hypoxie, ALDH2 – aldehyddehydrogenáza 2.

*- statisticky významný rozdíl SSM vs. IMFM ($p < 0,05$)

- statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie ($p < 0,05$)

6. Diskuze

Existuje řada možných postupů izolace subpopulací mitochondrií, ale je obtížné zvolit ten nejvhodnější. Jedním z hlavních problémů je volba správného způsobu homogenizace myokardu tak, aby byl získán vysoký výtěžek mitochondrií a zároveň byly mitochondrie plně funkční. My jsme zvolili pro izolaci mitochondrií modifikovaný postup, který vycházel z práce Kavazise *et al.*, kteří použili k homogenizaci myokardu polytron a pro uvolnění IMFM z kontraktilního aparátu bakteriální proteázu nagarázu (Kavazis *et al.*, 2008). Délka homogenizace LV byla optimalizována s ohledem množství tkáně a typ použitého polytronu. Získali jsme frakci SSM a frakci IMFM. Podobně jako u předchozích prací byl výtěžek izolovaných IMFM větší oproti SSM (Palmer *et al.*, 1977; Kavazis *et al.*, 2008). Vyšší výtěžky však při izolaci SSM a IMFM z celého srdce získali Palmer *et al.*, kteří použili k izolaci kombinaci polytropu a skleněného Potter-Elvehjem homogenizátoru (Palmer *et al.*, 1977). V našem případě, kdy jsme použili k homogenizaci myokardu polytron, tkáň nebyla rovnoměrně rozbita a docházelo při diferenciální centrifugaci k jejím ztrátám. K dosažení lepšího rozbití tkáně a vyšším výtěžkům by tedy bylo pravděpodobně lepší namísto polytronu zavedení skleněného Potter-Elvehjem homogenizátoru, který tkáň rozbije lépe. Izolace subpopulací mitochondrií v jednotlivých laboratořích se liší také tím, že používají různé rychlosti centrifugace a výsledné frakce tak mohou mít rozdílné složení mitochondrií. V dalších laboratořích používají k izolaci SSM a IMFM dělení srdečního homogenátu na hustotním gradientu Pergolu po tom, co byl homogenát vystaven působení proteázy. Za SSM je považována lehčí frakce mitochondrií a za IMFM ta těžší (Chemnitius *et al.*, 1993; Ferreira *et al.*, 2012). Domníváme se, že takto získané frakce mitochondrií jsou odlišné od těch, které jsou získány působením proteázy pouze na IMFM (Palmer *et al.*, 1977; Kavazis *et al.*, 2008), a že dojde pravděpodobně k promísení mitochondrií pod sarkolemou s těmi, které by jinak zůstaly mezi myofibrilami a naopak. Z těchto důvodů je obtížné srovnávání výsledků po různém způsobu frakcionace.

Jedním ze způsobů, jak ověřit funkčnost izolovaných mitochondrií, je měření jejich spotřeby kyslíku. Index respirační kontroly byl u námi izolovaných subpopulací mitochondrií podobný, hodnota kolem 16 poukazovala na jejich dobrý stav. Naměřili jsme cca 1,5krát vyšší spotřebu kyslíku u SSM oproti IMFM stejně tak jako Palmer *et al.* (Palmer *et al.*, 1977). To souhlasí také s dříve publikovanými výsledky, kdy bylo zjištěno, že IMFM mají oproti SSM

vyšší oxidativní metabolismus (Palmer et al., 1977; Hoppel et al., 1982; Palmer et al., 1985; Riva et al., 2005). Navíc bylo zjištěno, že IMFM mají oproti SSM vyšší aktivity komplexů I, II a III ETC (Palmer et al., 1985) a ATP syntázy (Ferreira et al., 2012). To potvrzuje domněnku, že mitochondrie situované mezi myofibrilami kontraktálního aparátu tvoří energii ve formě ATP především pro energeticky náročný svalový stah a SSM tvoří ATP především pro ATPázy v plazmatické membráně.

V rámci charakterizace subpopulací mitochondrií jsme ověřovali některé již publikované biochemické rozdíly mezi SSM a IMFM. Z těchto jsme vybrali mitochondriální enzymy CS a SDH. Naměřili jsme vyšší aktivitu CS u IMFM oproti SSM, ale rozdíl nebyl vzhledem k většímu rozptylu výsledků signifikantní. U SDH jsme rozdíl mezi subpopulacemi nepozorovali. Tím jsme ne zcela potvrdili výsledky Palmera *et al.*, kteří naměřili vyšší specifickou aktivitu CS i SDH u IMFM oproti SSM. Velká část prací se zabývala zkoumáním subpopulací mitochondrií z myokardu potkana, Hoppel *et al.* porovnávali SSM a IMFM izolované ze srdcí křečků. Specifické aktivity CS a SDH naměřili u obou subpopulací stejné. Pravděpodobně tedy existují v těchto parametrech mezidruhové rozdíly (Hoppel et al., 1989). V obou výše citovaných studiích byly mitochondrie izolovány z celého srdce, kdežto my jsme použili jen jeho levou komoru, popřípadě i septum. Dalším možným vysvětlením námi naměřených odlišných enzymových aktivit by mohly být nedávno publikované výsledky poukazující na sezónní rozdíly v aktivitách některých enzymů u potkanů. V létě byly oproti jiným ročním obdobím u potkanů vyšší aktivity a hladiny NADPH oxidázy a xanthinoxidázy (Konior et al., 2011). Na základě těchto výsledků a skutečnosti, že většina našich vzorků mitochondrií byla izolována v červnu, můžeme předpokládat, že sezónní rozdíly měly vliv i na aktivity námi zkoumaných enzymů.

Přítomnost Cx43 u SSM a jeho absence u IMFM potvrdila publikované výsledky Boengler *et al.*, kteří zjistili, že se Cx43 vyskytuje jen u SSM a ne u IMFM (Boengler et al., 2009). To bylo potvrzeno Johansenem *et al.* (Johansen et al., 2011) a podpořeno výsledky, kdy se mitoK_{ATP} na IMFM neotvírají na rozdíl od těch na SSM stimulací PKC a diazoxidu (lék proti hypertenzi, vazodilatátor), protože Cx43 hraje roli v jimi indukovaném otevírání mitoK_{ATP} (Rottlaender et al. 2010). Můžeme si ale klást otázku, zda nebyl Cx43 z IMFM odstraněn působením bakteriální proteázy nazarázy či trypsinu, jenž jsou používány k uvolnění IMFM z kontraktálního aparátu. Bylo prokázáno, že se Cx43 vyskytuje především ve vnitřní mitochondriální membráně (Boengler et al., 2005; Rodriguez-Sinovas et al., 2006; Boengler et al., 2009; Miro-Casas et al., 2009) a jeho C-konec směřuje do intermembránového prostoru (Boengler et al., 2009; Miro-Casas et al., 2009), tudíž by neměl

být vystaven působení proteázy. Práce Azarashvili *et al.* však ukazují, že se Cx43 vyskytuje u obou subpopulací mitochondrií. Způsob izolace mitochondrií se však lišil od postupu Boengler *et al.* tím, že k uvolnění IMFM použili místo nagarázy digitonin (Azarashvili *et al.*, 2011). Do budoucna by tedy bylo potřeba vyřešit otázku, zda je Cx43 skutečně přítomen nebo nepřítomen v IMFM a tím problém jestli může být považován za marker SSM.

Vzhledem k tomu, že je Cx43 především proteinem plazmatické membrány, ověřili jsme kontaminaci frakcí mitochondrií pomocí detekce proteinu plazmatické membrány - Na^+/K^+ -ATPázy podobně jako u jiných již publikovaných prací, které se zabývají problematikou subpopulací mitochondrií (Boengler *et al.*, 2009; Johansen *et al.*, 2011). Bylo tedy nezbytné zavedení stanovení tohoto proteinu metodou imunodetekce pomocí specifické protilátky proti α podjednotce Na^+/K^+ -ATPázy. Pro určení specifity ECL signálu sledovaného enzymu jsem použila standard molekulových hmotností. Homogenát mozku, který je tkání s nejvyšším množstvím Na^+/K^+ -ATPázy a mikrosomální frakci získanou při izolaci mitochondrií jsem použila jako pozitivní kontrolu. Podle získaných výsledků se nám podařilo izolovat frakce mitochondrií, které nebyly kontaminovány plazmatickou membránou, detekovaný Cx43 u SSM tedy nepocházel z plazmatické membrány. V nedávné době bylo také zjištěno, že IMFM obsahují oproti SSM výrazně větší množství proteinu mitofilinu, ten by tedy pravděpodobně mohl být používán jako marker IMFM (Ferreira *et al.*, 2012).

V další části své práce jsem se zabývala vlivem IHA na subpopulace mitochondrií. Vlivem IHA došlo ke snížení hmotnosti potkanů, což je ve shodě s dřívějšími pracemi, které se zabývaly adaptací na IHA (Neckář *et al.*, 2002; Neckář *et al.* 2005; Ravingerová *et al.*, 2006; Kolář *et al.* 2007). Potkani pravděpodobně v důsledku stresu způsobeného adaptací na vysokou nadmořskou výšku omezili příjem potravy.

Srdce adaptovaných potkanů bylo signifikantně těžší než srdce normoxických potkanů. Tento rozdíl je způsoben především hypertrofií pravé komory srdeční, jež je následkem plicní hypertenze způsobené nadmořskou výškou. Při plicní hypertenzi dochází k zvýšenému tlaku krve. Relativní hmotnost pravé komory (RV/BW) i relativní hmotnost levé komory (LV/BW) se po adaptaci na IHA hypoxii zvýšila, ale u LV/BW mírněji, což je v souladu s dříve publikovanými pracemi (Neckář *et al.*, 2005; Ravingerová *et al.*, 2006; Kolář *et al.*, 2007).

V této diplomové práci jsem se zabývala nejen přítomností Cx43 u subpopulací mitochondrií, ale očekávali jsme také, že by mohl mitochondriální Cx43 hrát roli v kardioprotekci indukované adaptací na IHA, ale k žádným změnám v jeho hladině u SSM nedošlo a u IMFM nebyl přítomen.

Cx43 je hlavním konexinem v srdečních komorách a vyskytuje se především na plazmatické membráně, kde tvoří transmembránové kanály konexony ve formě hexamerů které se spojují s konexony sousedících buněk a umožňují výměnu molekul až do velikosti 1 kDa (Boengler et al., 2006). V dospělém myokardu se konexony vyskytují v místě spojení buněk zvaných interkalární disky, kde díky nim dochází k šíření akčního potenciálu důležitého pro koordinovaný svalový stah (Lo et al., 2000). Bylo prokázáno, že tvorba konexonů hraje roli v kardioprotekci indukované ischemickým preconditioningem (Miura et al., 2010).

Existují důkazy, že i mitochondriální Cx43 hraje roli v kardioprotekci. Předpokládá se, že Cx43 tvoří ve vnitřní mitochondriální membráně struktury podobné hemikanálům, které umožňují vtok K^+ do mitochondrií (Miro-Casas et al., 2009). Na myším modelu bylo zjištěno, že Cx43 je v SSM cytoprotektivním mediátorem, protože stimuluje mitoK_{ATP} kanály. Tyto kanály u IMFM byly necitlivé k aktivaci PKC a diazoxidem, protože neobsahují Cx43 (Rottlaender et al., 2010). U potkanů a prasat bylo zjištěno, že ischemický preconditioning zvyšuje lokalizaci Cx43 v mitochondriích (Boengler et al., 2005), kde se účastní tvorby ROS indukované diazoxidem (Heinzel et al., 2005). V srdcích potkanů, kde byl obsah mitochondriálního Cx43 redukován inhibicí jeho importu, byl odstraněn farmakologický preconditioning (Rodriguez-Sinovas et al., 2006) a ischemickým preconditioningem navozená kardioprotekce se ztrácí u Cx43 $-/-$ myši (Schwanke et al., 2002; Schwanke et al., 2003). Vzhledem k těmto zjištěním a pravděpodobné nepřítomnosti Cx43 u IMFM (Boengler et al., 2009), se SSM a IMFM pravděpodobně odlišují ve své funkci v kardioprotekci.

Naše výsledky ukázaly, že IHA nemá vliv na aktivity CS a SDH ani u jedné ze subpopulací mitochondrií. Již dříve bylo na srdečním homogenátu potkanů pozorováno, že adaptace na vysokou nadmořskou výšku nemá vliv na specifickou aktivitu CS (Kennedy et al., 2001). My jsme na homogenátu naměřili po adaptaci na IHA nižší aktivitu CS (data neukázána), to by mohlo znamenat, že po adaptaci na IHA došlo k poklesu množství mitochondrií. To podporují výsledky Ježkové *et al.*, kteří ukázali, že po IHA dochází k poklesu množství kardiolipinu, který se vyskytuje především ve vnitřní mitochondriální membráně, což by mohlo znamenat nižší podíl mitochondriálních membrán vůči ostatním membránám nebo pouze pokles jeho množství v membránách mitochondrií (Ježková et al., 2002). Je ale známo, že chronická hypoxie zvyšuje počet mitochondrií v srdci za současného zmenšení jejich průměrného objemu (Ošťádal, 2002).

Po adaptaci na IHA jsme nezaznamenali signifikantní změny mitochondriálního proteinu ani u jedné ze subpopulací mitochondrií podobně jako Kavazis *et al.* po adaptaci na vytrvalostní cvičení.

Původně jsme se domnívali, že by adaptace na IHA mohla mít podobný kardioprotektivní účinek jako vytrvalostní cvičení, které zvyšuje koncentraci primárních antioxidantních enzymů včetně MnSOD u obou subpopulací mitochondrií (Kavazis *et al.*, 2008). Je třeba zmínit, že vytrvalostní cvičení nemělo podle řady prací vždy vliv na hladiny a aktivity antioxidantních enzymů včetně MnSOD (shrnuje v Kavazis, 2009). Tyto rozdíly mezi výsledky různých laboratoří jsou pravděpodobně důsledkem odlišných postupů např. v izolaci mitochondrií. Zjistili jsme, že adaptace na IHA nemá vliv na expresi MnSOD ani u jedné ze subpopulací mitochondrií. V naší laboratoři bylo již dříve zjištěno, že adaptace potkanů na IHA signifikantně zvyšuje expresi MnSOD v mitochondriích izolovaných z LV srdce potkana (Balková *et al.*, 2011). Nebyla však pozorována žádná změna v expresi MnSOD na úrovni homogenátu z myokardu levé komory (Kolář *et al.*, 2007). Naší hypotézou bylo, že by tuto nesrovnalost mohly objasnit rozdíly v hladině MnSOD mezi subpopulacemi mitochondrií. Balková *et al.* totiž izolovali srdeční mitochondrie jen po rozbití sarkolemy homogenizací tkáně, tedy získali pravděpodobně jen frakci SSM. Je známo, že chronická hypoxie je spojena se zvýšeným oxidačním stresem (Chen *et al.*, 2005a; Kolář *et al.*, 2007). Při experimentech, kdy byl v průběhu adaptace na IHA potkanům podáván antioxidant N-acetylcystein, zmizelo IHA indukované zvýšení hladiny a aktivity antioxidantního enzymu MnSOD v mitochondriích (Balková *et al.*, 2011). N-acetylcystein odstranil protektivní efekt IHA a eliminoval zvýšení exprese PKC- δ indukované IHA (Kolář *et al.*, 2007). Z toho můžeme usoudit, že ROS hrají roli v kardioprotekci stejně tak, jako se účastní signalizace v kardioprotekci indukované ischemickým preconditioningem (Yellon a Downey., 2003). Vzhledem k většímu zastoupení IMFM v kardiomyocytech by snad mohla námi zjištěná nezměněná exprese MnSOD u IMFM po IHA odrážet hladiny MnSOD v homogenátu.

Možným vysvětlením diskrepance jsou nedávné výsledky Koniora *et al.* poukazující na sezónní rozdíly v aktivitách a hladinách některých enzymů u potkanů a morčat. V době pozdního jara a léta vzrůstá aktivita a množství srdeční NADPH oxidázy a xanthinoxidázy a zároveň je snížena exprese SOD, dochází tedy k nadprodukci O_2^- (Konior *et al.*, 2011). Vzhledem k tomu, že většina našich pokusů probíhala na zvířatech v pozdním jaře (červen), mohly by být výsledky touto skutečností ovlivněny a rozdíly s Balkovou *et al.* vysvětleny.

U IMFM jsme oproti SSM zjistili signifikantně vyšší hladinu ALDH2, která odstraňuje toxické aldehydy vzniklé při peroxidaci lipidů v důsledku působení ROS. IMFM

pravděpodobně vzhledem k vyššímu oxidativnímu metabolismu také produkují větší množství aldehydů a vyžadují tak proti nim zvýšenou ochranu. Nepotvrdili jsme však naši hypotézu, že po adaptaci na IHA vzroste hladina mitochondriální ALDH2. Výsledkem adaptace na IHA byl naopak pokles exprese ALDH2 u obou subpopulací mitochondrií. V případě, že by následovala ischemie, kdy dochází ke zvýšení koncentrace 4HNE (Blasig et al., 1995), by tento pokles v ALDH2 buňky pravděpodobně neochránil. Výsledky některých laboratoří poukazují na roli ALDH2 v endogenní kardioprotekci indukované ethanolem a aktivátorem ALDH2 Alda-1 (Chen et al., 2008b).

Je známo, že nízké koncentrace 4HNE v různých typech buněk zvyšují expresi transkripčního faktoru AP-1 skrze aktivaci PKC, zvláště PKC- δ (Poli et al., 2008), která je zapojena v mechanismu endogenní kardioprotekce indukované IHA jak ukázaly výsledky našeho pracoviště (Kolář et al., 2007). Tedy by bylo možné uvažovat o tom, že by nízká koncentrace 4HNE v srdečních buňkách mohla být kardioprotektivní.

K výzkumu v naší laboratoři jsem přispěla především zavedením postupu izolace mitochondriálních subpopulací, přičemž by bylo do budoucna dobré vyřešit, zda je Cx43 skutečně markerem SSM. Standardizovaná metoda přípravy mitochondriálních subpopulací umožní rozšířit studium mechanismu kardioprotektivního účinku IHA.

7. Shrnutí

Ve své diplomové práci jsme dospěla k následujícím výsledkům:

1. Subpopulace mitochondrií

IMFM versus SSM:

- mají vyšší spotřebu kyslíku
- vyšší hladinu ALDH2
- neobsahují Cx43

2. Vliv chronické hypoxie

Chronická hypoxie:

- nemá žádný efekt na CS, SDH, MnSOD ani Cx43
- snižuje signifikantně hladinu ALDH2 u obou mitochondriálních subpopulací

Závěrem:

Podařilo se nám izolovat dvě funkčně odlišné subpopulace mitochondrií, získané frakce nebyly kontaminovány plazmatickou membránou a Cx43 se vyskytoval jen u SSM. Adaptace na chronickou hypoxii neměla žádný vliv na většinu zkoumaných proteinů, kromě ALDH2.

8. Zdroje literatury

- Agostoni P, Swenson ER, Bussotti M, Revera M, Meriggi P, Faini A, Lombardi C, Bilo G, Giuliano A, Bonacina D, Modesti PA, Mancina G a Parati G. 2011. High-altitude exposure of three weeks duration increases lung diffusing capacity in humans. *Journal of applied physiology* 110(6):1564-1571.
- Amersham: ECL Western blotting detection reagents ECL Western blotting analysis system; Instruction manual, procedures & troubleshooting (1997)
- Asemu G, Papousek F, Ošťádal B a Kolář F. 1999. Adaptation to high altitude hypoxia protects the rat heart against ischemia-induced arrhythmias. Involvement of mitochondrial K(ATP) channel. *Journal of molecular and cellular cardiology* 31(10):1821-1831.
- Azarashvili T, Baburina Y, Grachev D, Krestinina O, Evtodienko Y, Stricker R a Reiser G. 2011. Calcium-induced permeability transition in rat brain mitochondria is promoted by carbenoxolone through targeting connexin43. *American journal of physiology Cell physiology* 300(3):C707-720.
- Balková P, Hlaváčková M, Milerová M, Neckář J, Kolář F, Novák F a Nováková O. 2011. N-acetylcysteine treatment prevents the up-regulation of MnSOD in chronically hypoxic rat hearts. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 60(3):467-474.
- Bass A, Ošťádal B, Procházka J, Pelouch V, Samanek M a Stejskalová M. 1989. Intermittent high altitude--induced changes in energy metabolism in the rat myocardium and their reversibility. *Physiologia Bohemoslovaca* 38(2):155-161.
- Bio-Rad: Immun-Blot[®] Assay Kit; Instruction manual, 1996.
- Blasig IE, Grune T, Schonheit K, Rohde E, Jakstadt M, Haseloff RF a Siems WG. 1995. 4-Hydroxynonenal, a novel indicator of lipid peroxidation for reperfusion injury of the myocardium. *The American journal of physiology* 269(1 Pt 2):H14-22.
- Boengler K, Dodoni G, Rodriguez-Sinovas A, Cabestrero A, Ruiz-Meana M, Gres P, Konietzka I, Lopez-Iglesias C, Garcia-Dorado D, Di Lisa F, Heusch G a Schulz R. 2005. Connexin 43 in cardiomyocyte mitochondria and its increase by ischemic preconditioning. *Cardiovascular research* 67(2):234-244.
- Boengler K, Schulz R a Heusch G. 2006. Connexin 43 signalling and cardioprotection. *Heart* 92(12):1724-1727.
- Boengler K, Stahlhofen S, van de Sand A, Gres P, Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, Heusch G a Schulz R. 2009. Presence of connexin 43 in subsarcolemmal, but not in interfibrillar cardiomyocyte mitochondria. *Basic research in cardiology* 104(2):141-147.

- Bolli R. 2000. The late phase of preconditioning. *Circulation research* 87(11):972-983.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72:248-254.
- Canepa A, Chavez R, Hurtado A, Rotta A a Velasquez T. 1956. Pulmonary circulation at sea level and at high altitudes. *Journal of applied physiology* 9(3):328-336.
- Cordis GA, Maulik N, Bagchi D, Engelman RM a Das DK. 1993. Estimation of the extent of lipid peroxidation in the ischemic and reperfused heart by monitoring lipid metabolic products with the aid of high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography* 632(1-2):97-103.
- Ding HL, Zhu HF, Dong JW, Zhu WZ a Zhou ZN. 2004. Intermittent hypoxia protects the rat heart against ischemia/reperfusion injury by activating protein kinase C. *Life sciences* 75(21):2587-2603.
- Doorn JA, Hurley TD a Petersen DR. 2006. Inhibition of human mitochondrial aldehyde dehydrogenase by 4-hydroxynon-2-enal and 4-oxonon-2-enal. *Chemical research in toxicology* 19(1):102-110.
- Doser TA, Turdi S, Thomas DP, Epstein PN, Li SY a Ren J. 2009. Transgenic overexpression of aldehyde dehydrogenase-2 rescues chronic alcohol intake-induced myocardial hypertrophy and contractile dysfunction. *Circulation* 119(14):1941-1949.
- Duilio C, Ambrosio G, Kuppusamy P, DiPaula A, Becker LC a Zweier JL. 2001. Neutrophils are primary source of O₂ radicals during reperfusion after prolonged myocardial ischemia. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 280(6):H2649-2657.
- Essop MF. 2007. Cardiac metabolic adaptations in response to chronic hypoxia. *The Journal of physiology* 584(Pt 3):715-726.
- Fannin SW, Lesnefsky EJ, Slabe TJ, Hassan MO a Hoppel CL. 1999. Aging selectively decreases oxidative capacity in rat heart interfibrillar mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics* 372(2):399-407.
- Ferreira RM, Vitorino R, Padrao AI, Moreira-Goncalves D, Alves RM, Duarte JA a Amado F. 2012. Spatially distinct mitochondrial populations exhibit different mitofilin levels. *Cell biochemistry and function*.
- Gomez LA, Heath SH a Hagen TM. 2012. Acetyl-L-carnitine supplementation reverses the age-related decline in carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) activity in interfibrillar mitochondria without changing the L-carnitine content in the rat heart. *Mechanisms of ageing and development* 133(2-3):99-106.

- Hamilton KL, Powers SK, Sugiura T, Kim S, Lennon S, Tumer N a Mehta JL. 2001. Short-term exercise training can improve myocardial tolerance to I/R without elevation in heat shock proteins. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 281(3):H1346-1352.
- Hamilton KL, Quindry JC, French JP, Staib J, Hughes J, Mehta JL a Powers SK. 2004. MnSOD antisense treatment and exercise-induced protection against arrhythmias. *Free radical biology & medicine* 37(9):1360-1368.
- Hannun YA a Obeid LM. 2002. The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *The Journal of biological chemistry* 277(29):25847-25850.
- Heinzel FR, Luo Y, Li X, Boengler K, Buechert A, Garcia-Dorado D, Di Lisa F, Schulz R a Heusch G. 2005. Impairment of diazoxide-induced formation of reactive oxygen species and loss of cardioprotection in connexin 43 deficient mice. *Circulation research* 97(6):583-586.
- Hlaváčková M, Kožichová K, Neckář J, Kolář F, Musters RJ, Novák F a Nováková O. 2010. Up-regulation and redistribution of protein kinase C-delta in chronically hypoxic heart. *Molecular and cellular biochemistry* 345(1-2):271-282.
- Hofer T, Servais S, Seo AY, Marzetti E, Hiona A, Upadhyay SJ, Wohlgemuth SE a Leeuwenburgh C. 2009. Bioenergetics and permeability transition pore opening in heart subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria: effects of aging and lifelong calorie restriction. *Mechanisms of ageing and development* 130(5):297-307.
- Hoppel CL, Tandler B, Fujioka H a Riva A. 2009. Dynamic organization of mitochondria in human heart and in myocardial disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 41(10):1949-1956.
- Hoppel CL, Tandler B, Parland W, Turkaly JS a Albers LD. 1982. Hamster cardiomyopathy. A defect in oxidative phosphorylation in the cardiac interfibrillar mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 257(3):1540-1548.
- Hoshida S, Yamashita N, Otsu K a Hori M. 2002. Repeated physiologic stresses provide persistent cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in rats. *Journal of the American College of Cardiology* 40(4):826-831.
- Huang TT, Carlson EJ, Kozy HM, Mantha S, Goodman SI, Ursell PC a Epstein CJ. 2001. Genetic modification of prenatal lethality and dilated cardiomyopathy in Mn superoxide dismutase mutant mice. *Free radical biology & medicine* 31(9):1101-1110.
- Hurtado A. 1960. Some clinical aspects of life at high altitudes. *Annals of internal medicine* 53:247-258.
- Chemnitus JM, Manglitz T, Kloeppel M, Doenst T, Schwartz P, Kreuzer H a Zech R. 1993. Rapid preparation of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondrial subpopulations from cardiac muscle. *The International journal of biochemistry* 25(4):589-596.

- Chen CH, Budas GR, Churchill EN, Disatnik MH, Hurley TD a Mochly-Rosen D. 2008b. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science* 321(5895):1493-1495.
- Chen CH, Sun L a Mochly-Rosen D. 2010. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase and cardiac diseases. *Cardiovascular research* 88(1):51-57.
- Chen L, Einbinder E, Zhang Q, Hasday J, Balke CW a Scharf SM. 2005a. Oxidative stress and left ventricular function with chronic intermittent hypoxia in rats. *American journal of respiratory and critical care medicine* 172(7):915-920.
- Chen L, Lu XY, Li J, Fu JD, Zhou ZN a Yang HT. 2006c. Intermittent hypoxia protects cardiomyocytes against ischemia-reperfusion injury-induced alterations in Ca^{2+} homeostasis and contraction via the sarcoplasmic reticulum and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange mechanisms. *American journal of physiology Cell physiology* 290(4):C1221-1229.
- Chen Q, Hoppel CL a Lesnefsky EJ. 2006b. Blockade of electron transport before cardiac ischemia with the reversible inhibitor amobarbital protects rat heart mitochondria. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 316(1):200-207.
- Chen Q, Moghaddas S, Hoppel CL a Lesnefsky EJ. 2006a. Reversible blockade of electron transport during ischemia protects mitochondria and decreases myocardial injury following reperfusion. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 319(3):1405-1412.
- Chen Q, Moghaddas S, Hoppel CL a Lesnefsky EJ. 2008a. Ischemic defects in the electron transport chain increase the production of reactive oxygen species from isolated rat heart mitochondria. *American journal of physiology Cell physiology* 294(2):C460-466.
- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL a Lesnefsky EJ. 2003. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *The Journal of biological chemistry* 278(38):36027-36031.
- Chen Z, Foster MW, Zhang J, Mao L, Rockman HA, Kawamoto T, Kitagawa K, Nakayama KI, Hess DT a Stamler JS. 2005b. An essential role for mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitroglycerin bioactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(34):12159-12164.
- Chen Z, Siu B, Ho YS, Vincent R, Chua CC, Hamdy RC a Chua BH. 1998. Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *Journal of molecular and cellular cardiology* 30(11):2281-2289.
- Chen Z a Stamler JS. 2006. Bioactivation of nitroglycerin by the mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Trends in cardiovascular medicine* 16(8):259-265.
- Churchill EN, Disatnik MH a Mochly-Rosen D. 2009. Time-dependent and ethanol-induced cardiac protection from ischemia mediated by mitochondrial translocation of varepsilonPKC and activation of aldehyde dehydrogenase 2. *Journal of molecular and cellular cardiology* 46(2):278-284.

- Ježková J, Nováková O, Kolář F, Tvrzická E, Neckář J a Novák F. 2002. Chronic hypoxia alters fatty acid composition of phospholipids in right and left ventricular myocardium. *Molecular and cellular biochemistry* 232(1-2):49-56.
- Jin ZQ, Zhou HZ, Cecchini G, Gray MO a Karliner JS. 2005. MnSOD in mouse heart: acute responses to ischemic preconditioning and ischemia-reperfusion injury. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 288(6):H2986-2994.
- Johansen D, Sanden E, Hagve M, Chu X, Sundset R a Ytrehus K. 2011. Heptanol triggers cardioprotection via mitochondrial mechanisms and mitochondrial potassium channel opening in rat hearts. *Acta physiologica* 201(4):435-444.
- Judge S, Jang YM, Smith A, Hagen T a Leeuwenburgh C. 2005b. Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac interfibrillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19(3):419-421.
- Judge S, Jang YM, Smith A, Selman C, Phillips T, Speakman JR, Hagen T a Leeuwenburgh C. 2005a. Exercise by lifelong voluntary wheel running reduces subsarcolemmal and interfibrillar mitochondrial hydrogen peroxide production in the heart. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 289(6):R1564-1572.
- Judge S a Leeuwenburgh C. 2007. Cardiac mitochondrial bioenergetics, oxidative stress a aging. *American journal of physiology Cell physiology* 292(6):C1983-1992.
- Kasalický J, Ressler J, Urbanová D, Widimský J, Ošťádal B, Pelouch V, Vízek M a Procházka J. 1977. Relative organ blood flow in rats exposed to intermittent high altitude hypoxia. *Pflugers Archiv: European journal of physiology* 368(1-2):111-115.
- Kavazis AN. 2009. Exercise preconditioning of the myocardium. *Sports medicine* 39(11):923-935.
- Kavazis AN, Alvarez S, Talbert E, Lee Y a Powers SK. 2009. Exercise training induces a cardioprotective phenotype and alterations in cardiac subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondrial proteins. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 297(1):H144-152.
- Kavazis AN, McClung JM, Hood DA a Powers SK. 2008. Exercise induces a cardiac mitochondrial phenotype that resists apoptotic stimuli. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 294(2):H928-935.
- Kennedy SL, Stanley WC, Panchal AR a Mazzeo RS. 2001. Alterations in enzymes involved in fat metabolism after acute and chronic altitude exposure. *Journal of applied physiology* 90(1):17-22.
- Kolář F, Ježková J, Balková P, Břeh J, Neckář J, Novák F, Nováková O, Tomášová H, Srbová M, Ošťádal B, Wilhelm J a Herget J. 2007. Role of oxidative stress in PKC-delta

upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 292(1):H224-230.

- Kolář F, Neckář J a Ošťádal B. 2005. MCC-134, a blocker of mitochondrial and opener of sarcolemmal ATP-sensitive K⁺ channels, abrogates cardioprotective effects of chronic hypoxia. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 54(4):467-471.
- Kolář F, Ošťádal B, Procházka J, Pelouch V, Rajecová O, Štrec V a Barta E. 1988. Age-dependent influence of a moderate altitude (1,350 m) on the rat cardiopulmonary system. *Physiologia Bohemoslovaca* 37(5):443-450.
- Kolář F, Ošťádal B, Procházka J, Pelouch V a Widimský J. 1989. Comparison of cardiopulmonary response to intermittent high-altitude hypoxia in young and adult rats. *Respiration; international review of thoracic diseases* 56(1-2):57-62.
- Konior A, Klemenská E, Brudek M, Podolecká E, Czarnowska E a Beresewicz A. 2011. Seasonal superoxide overproduction and endothelial activation in guinea-pig heart; seasonal oxidative stress in rats and humans. *Journal of molecular and cellular cardiology* 50(4):686-694.
- Kopecký M a Daum S. 1958. [Adaptation of the myocardium to altitude anoxia]. *Československá fysiologie / Ústřední ústav biologický* 7(3):218-219.
- Kroemer G. 2003. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochemical and biophysical research communications* 304(3):433-435.
- Lagranha CJ, Deschamps A, Aponte A, Steenbergen C a Murphy E. 2010. Sex differences in the phosphorylation of mitochondrial proteins result in reduced production of reactive oxygen species and cardioprotection in females. *Circulation research* 106(11):1681-1691.
- Lennon SL, Quindry JC, Hamilton KL, French JP, Hughes J, Mehta JL a Powers SK. 2004. Elevated MnSOD is not required for exercise-induced cardioprotection against myocardial stunning. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 287(2):H975-980.
- Lesnefsky EJ, Gudz TI, Migita CT, Ikeda-Saito M, Hassan MO, Turkaly PJ a Hoppel CL. 2001. Ischemic injury to mitochondrial electron transport in the aging heart: damage to the iron-sulfur protein subunit of electron transport complex III. *Archives of biochemistry and biophysics* 385(1):117-128.
- Lesnefsky EJ a Hoppel CL. 2003. Ischemia-reperfusion injury in the aged heart: role of mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics* 420(2):287-297.
- Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC a Epstein CJ. 1995. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nature genetics* 11(4):376-381.

- Lo CW. 2000. Role of gap junctions in cardiac conduction and development: insights from the connexin knockout mice. *Circulation research* 87(5):346-348.
- Ma H, Guo R, Yu L, Zhang Y a Ren J. 2011. Aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) rescues myocardial ischaemia/reperfusion injury: role of autophagy paradox and toxic aldehyde. *European heart journal* 32(8):1025-1038.
- Matés JM a Sánchez-Jiménez F. 1999. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 4:D339-345.
- McBride HM, Neuspiel M a Wasiak S. 2006. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Current biology: CB* 16(14):R551-560.
- McGrath JJ, Procházka J, Pelouch V a Ošťádal B. 1973. Physiological responses of rats to intermittent high-altitude stress: effects of age. *Journal of applied physiology* 34(3):289-293.
- Miro-Casas E, Ruiz-Meana M, Agullo E, Stahlhofen S, Rodriguez-Sinovas A, Cabestrero A, Jorge I, Torre I, Vazquez J, Boengler K, Schulz R, Heusch G a Garcia-Dorado D. 2009. Connexin43 in cardiomyocyte mitochondria contributes to mitochondrial potassium uptake. *Cardiovascular research* 83(4):747-756.
- Miura T, Miki T a Yano T. 2010. Role of the gap junction in ischemic preconditioning in the heart. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 298(4):H1115-1125.
- Monette JS, Gomez LA, Moreau RF, Bemer BA, Taylor AW a Hagen TM. 2010. Characteristics of the rat cardiac sphingolipid pool in two mitochondrial subpopulations. *Biochemical and biophysical research communications* 398(2):272-277.
- Morel OE, Buvry A, Le Corvoisier P, Tual L, Favret F, Leon-Velarde F, Crozatier B a Richalet JP. 2003. Effects of nifedipine-induced pulmonary vasodilatation on cardiac receptors and protein kinase C isoforms in the chronically hypoxic rat. *Pflugers Archiv: European journal of physiology* 446(3):356-364.
- Morten KJ, Ackrell BA a Melov S. 2006. Mitochondrial reactive oxygen species in mice lacking superoxide dismutase 2: attenuation via antioxidant treatment. *The Journal of biological chemistry* 281(6):3354-3359.
- Mortimer EA, Jr., Monson RR a MacMahon B. 1977. Reduction in mortality from coronary heart disease in men residing at high altitude. *The New England journal of medicine* 296(11):581-585.
- Murry CE, Jennings RB a Reimer KA. 1986. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74(5):1124-1136.

- Murry CE, Richard VJ, Reimer KA a Jennings RB. 1990. Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode. *Circulation research* 66(4):913-931.
- Neckář J, Marková I, Novák F, Nováková O, Szárszoi O, Ošťádal B a Kolář F. 2005. Increased expression and altered subcellular distribution of PKC-delta in chronically hypoxic rat myocardium: involvement in cardioprotection. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 288(4):H1566-1572.
- Neckář J, Papoušek F, Nováková O, Ošťádal B a Kolář F. 2002. Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive. *Basic research in cardiology* 97(2):161-167.
- Neckář J, Szarszoi O, Kóten L, Papoušek F, Ošťádal B, Grover GJ a Kolář F. 2002. Effects of mitochondrial K(ATP) modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats. *Cardiovascular research* 55(3):567-575.
- Ogita ZI a Markert CL. 1979. A miniaturized system for electrophoresis on polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry* 99(2):233-241.
- Ong SB a Hausenloy DJ. 2010. Mitochondrial morphology and cardiovascular disease. *Cardiovascular research* 88(1):16-29.
- Ošťádal B: protekce ischemického myokardu – dlouhodobá adaptace a preconditioning. V: *Klinická fyziologie krevního oběhu*. Ed. Fejfar Z a Přerovský I. Galén, Praha, 2002, 251-262.
- Ošťádal B a Kolář F. 2007. Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: beneficial and adverse effects. *Respiratory physiology & neurobiology* 158(2-3):224-236.
- Ošťádalová I, Ošťádal B, Jarkovská D a Kolář F. 2002. Ischemic preconditioning in chronically hypoxic neonatal rat heart. *Pediatric research* 52(4):561-567.
- Palmer JW, Tandler B a Hoppel CL. 1977. Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *The Journal of biological chemistry* 252(23):8731-8739.
- Palmer JW, Tandler B a Hoppel CL. 1985. Biochemical differences between subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria from rat cardiac muscle: effects of procedural manipulations. *Archives of biochemistry and biophysics* 236(2):691-702.
- Pecinová A, Drahota Z, Nůšková H, Pecina P a Houštěk J. 2011. Evaluation of basic mitochondrial functions using rat tissue homogenates. *Mitochondrion* 11(5):722-728.
- Perlman DH, Bauer SM, Ashrafian H, Bryan NS, Garcia-Saura MF, Lim CC, Fernandez BO, Infusini G, McComb ME, Costello CE a Feelisch M. 2009. Mechanistic insights into nitrite-induced cardioprotection using an integrated metabolomic/proteomic approach. *Circulation research* 104(6):796-804.

- Poli G, Schaur RJ, Siems WG a Leonarduzzi G. 2008. 4-hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Medicinal research reviews* 28(4):569-631.
- Powers SK, Quindry JC a Kavazis AN. 2008. Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free radical biology & medicine* 44(2):193-201.
- Ravingerová T, Matejíková J, Neckář J, Andelová E a Kolář F. 2007. Differential role of PI3K/Akt pathway in the infarct size limitation and antiarrhythmic protection in the rat heart. *Molecular and cellular biochemistry* 297(1-2):111-120.
- Riva A, Tandler B, Loffredo F, Vazquez E a Hoppel C. 2005. Structural differences in two biochemically defined populations of cardiac mitochondria. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 289(2):H868-872.
- Rodriguez-Sinovas A, Boengler K, Cabestrero A, Gres P, Morente M, Ruiz-Meana M, Konietzka I, Miro E, Totzeck A, Heusch G, Schulz R a Garcia-Dorado D. 2006. Translocation of connexin 43 to the inner mitochondrial membrane of cardiomyocytes through the heat shock protein 90-dependent TOM pathway and its importance for cardioprotection. *Circulation research* 99(1):93-101.
- Rotta C a Mattei C. 1956. [Data on the incidence of invalidating diseases in aging and aged]. *Minerva medica* 47(41):1568-1569.
- Rottlaender D, Boengler K, Wolny M, Michels G, Endres-Becker J, Motloch LJ, Schwaiger A, Buechert A, Schulz R, Heusch G a Hoppe UC. 2010. Connexin 43 acts as a cytoprotective mediator of signal transduction by stimulating mitochondrial KATP channels in mouse cardiomyocytes. *The Journal of clinical investigation* 120(5):1441-1453.
- Sasaki N, Sato T, Marban E a O'Rourke B. 2001. ATP consumption by uncoupled mitochondria activates sarcolemmal K(ATP) channels in cardiac myocytes. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 280(4):H1882-1888.
- Satoh K, Yamato A, Nakai T, Hoshi K, and Ichihara K. 1995. Effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on mitochondrial respiration in ischaemic dog hearts. *British journal of pharmacology* 116(2):1894-1898.
- Shimada T, Horita K, Murakami M a Ogura R. 1984. Morphological studies of different mitochondrial populations in monkey myocardial cells. *Cell and tissue research* 238(3):577-582.
- Scheffler IE. *Mitochondria*. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, 2008.
- Schwanke U, Konietzka I, Duschin A, Li X, Schulz R a Heusch G. 2002. No ischemic preconditioning in heterozygous connexin43-deficient mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 283(4):H1740-1742.

- Schwanke U, Li X, Schulz R a Heusch G. 2003. No ischemic preconditioning in heterozygous connexin 43-deficient mice--a further in vivo study. *Basic research in cardiology* 98(3):181-182.
- Siems WG, Hapner SJ a van Kuijk FJ. 1996. 4-hydroxynonenal inhibits Na(+)-K(+)-ATPase. *Free radical biology & medicine* 20(2):215-223.
- Solaini G a Harris DA. 2005. Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *The Biochemical journal* 390(Pt 2):377-394.
- Speechly-Dick ME, Mocanu MM a Yellon DM. 1994. Protein kinase C. Its role in ischemic preconditioning in the rat. *Circulation research* 75(3):586-590.
- Staněk V. Patofyziologie ischémie a infarktu myokardu. V: *Klinická fyziologie krevního oběhu*. Ed. Fejfar Z a Přerovský I. Galén, Praha, 2002, 201-232.
- Starnes JW, Barnes BD a Olsen ME. 2007. Exercise training decreases rat heart mitochondria free radical generation but does not prevent Ca²⁺-induced dysfunction. *Journal of applied physiology* 102(5):1793-1798.
- Suen DF, Norris KL a Youle RJ. 2008. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes & development* 22(12):1577-1590.
- Suh JH, Heath SH a Hagen TM. 2003. Two subpopulations of mitochondria in the aging rat heart display heterogenous levels of oxidative stress. *Free radical biology & medicine* 35(9):1064-1072.
- Suzuki K, Murtuza B, Sammut IA, Latif N, Jayakumar J, Smolenski RT, Kaneda Y, Sawa Y, Matsuda H a Yacoub MH. 2002. Heat shock protein 72 enhances manganese superoxide dismutase activity during myocardial ischemia-reperfusion injury, associated with mitochondrial protection and apoptosis reduction. *Circulation* 106(12 Suppl 1):I270-276.
- Suzuki K, Sawa Y, Ichikawa H, Kaneda Y a Matsuda H. 1999. Myocardial protection with endogenous overexpression of manganese superoxide dismutase. *The Annals of thoracic surgery* 68(4):1266-1271.
- Šochman J. Ischemické a reperfuční poškození myokardu. V: *Klinická fyziologie krevního oběhu*. Ed. Fejfar Z a Přerovský I. Galén, Praha, 2002, 235-248.
- Štípek S, Borovanský J, Čejková J, Homolka J, Klener P, Lukáš M, Špičák J, Tesař V, Zeman M, Zima T a Žák A. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. Grada Publishing, Praha, 2000.
- Towbin H, Staehelin T a Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(9):4350-4354.

- Uchida K a Stadtman ER. 1993. Covalent attachment of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. A possible involvement of intra- and intermolecular cross-linking reaction. *The Journal of biological chemistry* 268(9):6388-6393.
- Urbanová D, Pelouch V, Ošťádal B, Widimský J, Ressler J a Procházka J. 1977. The development of myocardial changes during intermittent high altitude hypoxia in rats. *Cor et vasa* 19(3):246-250.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M a Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39(1):44-84.
- Vasiliou V a Nebert DW. 2005. Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. *Human genomics* 2(2):138-143.
- Widimský J, Urbanová D, Ressler J, Ošťádal B, Pelouch V a Procházka J. 1973. Effect of intermittent altitude hypoxia on the myocardium and lesser circulation in the rat. *Cardiovascular research* 7(6):798-808.
- Williams R a Marber M. 2010. The winding road to cardioprotection. *Heart and metabolism* 46:25-33.
- Wispe JR, Clark JC, Burhans MS, Kropp KE, Korfhagen TR a Whitsett JA. 1989. Synthesis and processing of the precursor for human manganese-superoxide dismutase. *Biochimica et biophysica acta* 994(1):30-36.
- Wu JM a Hsieh TC. 2011. Resveratrol: a cardioprotective substance. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1215:16-21.
- Xie Y, Zhu WZ, Zhu Y, Chen L, Zhou ZN a Yang HT. 2004. Intermittent high altitude hypoxia protects the heart against lethal Ca²⁺ overload injury. *Life sciences* 76(5):559-572.
- Yamashita N, Hoshida S, Otsu K, Asahi M, Kuzuya T a Hori M. 1999. Exercise provides direct biphasic cardioprotection via manganese superoxide dismutase activation. *The Journal of experimental medicine* 189(11):1699-1706.
- Yellon DM a Downey JM. 2003. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiological reviews* 83(4):1113-1151.
- Yellon DM a Hausenloy DJ. 2007. Myocardial reperfusion injury. *The New England journal of medicine* 357(11):1121-1135.
- Yeung HM, Kravtsov GM, Ng KM, Wong TM a Fung ML. 2007. Chronic intermittent hypoxia alters Ca²⁺ handling in rat cardiomyocytes by augmented Na⁺/Ca²⁺ exchange and ryanodine receptor activities in ischemia-reperfusion. *American journal of physiology Cell physiology* 292(6):C2046-2056.
- Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA a Vinten-Johansen J. 2003. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during

reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. American journal of physiology Heart and circulatory physiology 285(2):H579-588.

Zhu HF, Dong JW, Zhu WZ, Ding HL a Zhou ZN. 2003. ATP-dependent potassium channels involved in the cardiac protection induced by intermittent hypoxia against ischemia/reperfusion injury. Life sciences 73(10):1275-1287.

Zhu WZ, Dong JW, Ding HL, Yang HT a Zhou ZN. 2004. Postnatal development in intermittent hypoxia enhances resistance to myocardial ischemia/reperfusion in male rats. European journal of applied physiology 91(5-6):716-722.

Zhu WZ, Xie Y, Chen L, Yang HT a Zhou ZN. 2006. Intermittent high altitude hypoxia inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores against reperfusion injury. Journal of molecular and cellular cardiology 40(1):96-106.